ORSAY
Série A. N°
N° d'ordre
127

T H E S E

Présentée à

LA FACULTE DES SCIENCES D' ORSAY

UNIVERSITE PARIS - SUD

Pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

SCIENCES BIOLOGIQUES

— Par

Kenji UCHIDA

STRUCTURE DE L'HIKIZIMICINE , NOUVEL ANTIBIOTIQUE NUCLEOSIDIQUE DE STREPTOMYCES A-5

Soutenue le 28 JUIN 1972 devant la Commission d'éxamen

MM.	E. LEDERER	PRESIDENT
	S. DAVID	EXAMINATEURS
	L. SZABO	
	SD.GERO	

THESE

PRESENTEE A

LA FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

SCIENCES BIOLOGIQUES

PAR

Kenji **UCHIDA**

STRUCTURE DE L'HIKIZIMYCINE, NOUVEL ANTIBIOTIQUE NUCLEOSIDIQUE DE STREPTOMYCES A-5

SOUTENUE LE 28 JUIN 1972 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN :

MM. E. LEDERER — PRESIDENT

S. DAVID
L. SZABO
S.D. GERO — EXAMINATEURS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Cette thèse a été effectuée à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette, dirigée par Monsieur le Professeur E. LEDERER. Je lui exprime ma respectueuse gratitude pour sa constante bienveillance à mon égard et pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur B.C. DAS, Maître de Recherche. Qu'il me soit permis de lui témoigner ma profonde reconnaissance pour l'enseignement qu'il m'a dispensé, pour ses critiques judicieuses, sa sagacité et sa patience dans de nombreuses discussions.

Je suis heureux de pouvoir remercier Monsieur J. DEFAYE, Maître de Recherche, qui m'a accueilli dans son équipe en 1969 et m'a enseigné les principes fondamentaux de la chimie des haloses.

Je remercie Monsieur le Professeur S. DAVID, Monsieur L. SZABO, Maître de Recherche et Monsieur S.D. GERO, Maître de Recherche, de me faire l'honneur de juger mon travail.

Je tiens tout particulièrement à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur A. OZAKI, Directeur de laboratoire, Santaku-Océan, Japon, qui m'a orienté vers ce sujet de recherche.

J'adresse mes remerciements chaleureux à Messieurs T. ISHIKURA, Y. SHIMAUCHI et T. ICHIKAWA pour leur aide précieuse à la préparation de l'hikizimycine.

Je remercie également tous mes camarades de laboratoire pour l'amitié qu'ils m'ont témoignée et les nombreux services qu'ils m'ont rendus, tout particulièrement à Monsieur et Madame TOUBIANA.

Enfin, j'adresse mes remerciements à Madame G. FARRUGIA pour son aide constante en français.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548022_0007

TABLES DES MATIERES

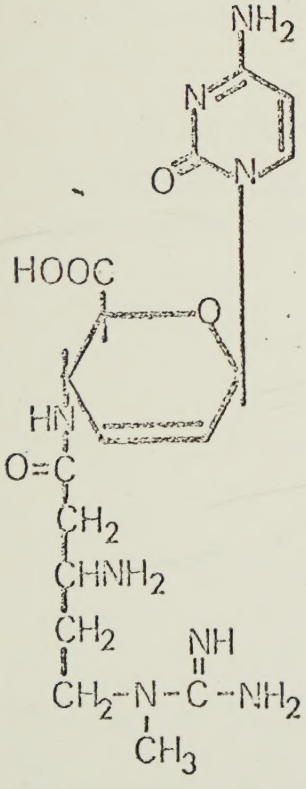
	Page
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	3
Streptomyces A-5	3
Isolement et propriétés de l'hikizimycine	7
CHAPITRE II	15
Structure de l'hikizimycine	15
Peracétylhikizimycine	15
N,N'-Diacétylhikizimycine	17
Formule brute de l'hikizimycine	19
Methanolyse de la N,N'-diacetylhikizimycine	20
Structure du Fragment I	20
Structure du Fragment II	23
Caractérisation de la tétrahydropyrimidine-2-one	26
Structure de l'hikosamine	27
Configuration de la partie acyclique de l'hikosamine	32
Localisation de la liaison des Fragments I et II	36
Configuration des deux liaisons glycosidiques de l'hikizimycine	37
CHAPITRE III	42
Discussion	42
PARTIE EXPERIMENTALE	53
BIBLIOGRAPHIE	76

INTRODUCTION

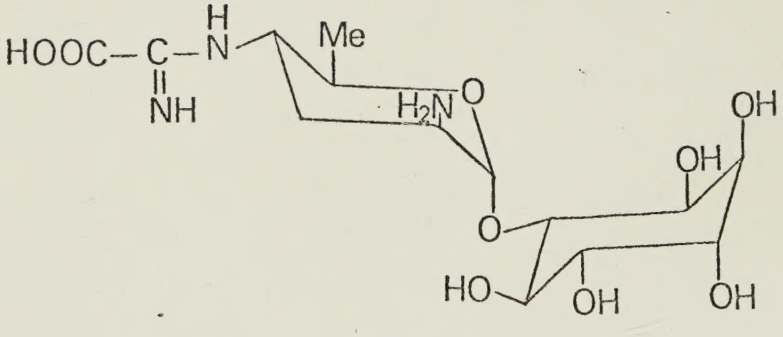
Dans les pays d'Asie où le riz constitue la majeure partie de l'alimentation, les maladies qui l'atteignent posent un important problème. La maladie la plus répandue est celle provoquée par Piricularia oryzae, Helminthosporium oryzae et Xanthomonas oryzae.

Les organo-mercuriques utilisés dans un premier temps comme thérapeutique ont été compte tenu de leur toxicité rapidement substitués par des fongicides. C'est au Japon que la recherche de ces fongicides a été le plus activement menée.

La Blasticidine-S[1], le premier antibiotique découvert inhibe la croissance de Piricularia oryzae. C'est un produit commercial; il présente cependant un inconvénient, celui d'irriter les muqueuses des personnes qui le manipulent. La Kasugamycine[2] de découverte plus récente n'a pas ce désavantage.



Blasticidine S



Kasugamycine

La découverte de l'Hikizimycine s'inscrit dans le cadre d'un "screening" entrepris pour trouver un antibiotique actif contre Helminthosporium oryzae.

L'Hikizimycine a été isolé à partir d'une souche de Streptomyces A-5. Cette dernière provient d'un échantillon de terre prélevé à Hikizi, Kanakawa-Ken(Japon).

Bien que l'Hikizimycine inhibe la croissance d'Helminthosporium oryzae et celle de Xanthomonas oryzae in vivo, elle ne peut être utilisée car elle est toxique envers les plantules de riz.

Ce travail comprend une première partie où les caractéristiques de la souche de Streptomyces A-5 ainsi que l'isolement les propriétés et l'activite biologiques de l'Hikizimycine sont étudiées.

Dans une deuxième partie l'élucidation de la structure est exposée.

L'ensemble de ces résultats fait l'objet du présent travail.

C H A P I T R E I

STREPTOMYCES A-5

Les propriétés morphologiques et physiologiques de l'Actinomycète, Streptomyces A-5 , ont été étudiées dans des milieux variés. L'observation au microscope montre que les mycelia sont ramifiés et les hyphes aériens sont longs et droits, sans verticilles. Les conidia forment des globules allongés (1,0μ - 1,5μ) à surface lisse.

Les caractéristiques de la culture de la souche A-5 sont indiquées dans le tableau I. La température optimum pour le développement des colonies est comprise entre 27° et 29° et le pH optimum entre 6,0 et 8,0.

Le tableau II présente les résultats des tests de l'utilisation du carbone (effectués selon la méthode de Pridham et Gottlieb[3]) ainsi que ceux d'autres tests biochimiques.

Comme on le voit, la culture de Streptomyces A-5 utilise pratiquement tous les composés testés, sauf le rhamnose; le sorbitol, le dulcitol; le raffinose et la cellulose.

Par comparaison avec la monographe de S.A. Waksman[4] la souche de Streptomyces A-5 est nouvelle. Cependant son identification définitive reste à établir.

T A B L E A U I

Caractéristiques de la culture de la souche A-5

Milieux	Croissance (couleur)	Mycelium aérien	Pigment soluble
Gélose de Czapek (27°)	moyen (de crème à orange)	moyen (blanc comme coton à rose gris)	néant
Gélose d'amidon - ammonium (27°)	moyen (de blanc à jaune)	moyen (blanc comme coton à rose)	néant
Gélose de glucose - asparagine (27°)	moyen, plissé (de crème à orange faible)	pauvre, (blanc)	néant
"Nutrient agar" avec glucose (27°)	bon, plissé (orange)	pauvre, (blanc)	néant
"Nutrient agar" (27°)	moyen (de crème à orange	néant ou pauvre	néant
Gélose + extrait de levure et de malt (27°)	bon (crème)	bon (blanc à rose)	néant
Pomme de terre (27°)	bon (orange)	moyen (blanc à rose)	néant
Gélatine (18-20°)	moyen (crème)	pauvre (blanc)	néant
Lait (27°)	un peu à la surface (de blanc à crème)	néant ou pauvre	néant
Gélose de malate de calcium (27°)	moyen (de crème à orange faible)	moyen (blanc)	néant
Gélose de tyrosine (27°)	moyen (de crème à orange faible)	néant ou pauvre)	néant
"Nutrient broth" (27°)	moyen, rond à la surface (de crème à orange faible)	moyen (blanc à rose faible)	néant
Bouillon de bactonitrate	moyen, rond à la surface (crème)	pauvre (blanc)	néant
Cellulose (27°)	néant	néant	néant

T A B L E A U II

Propriétés biochimiques de la souche A-5

Utilisation des sources carbonées	bonne croissance : glucose, galactose, mannose, fructose, arabinose, xylose, glycérine, maltose, saccharose, salicine, inuline, dextrine. croissance faible : inositol, mannitol, lactose, amidon. croissance nulle : rhamnose, sorbitol, dulcitol, raffinose, cellulose.
Formation de la mélanine	négative
Réduction du nitrate	négative
Utilisation de la cellulose	négative
Coagulation du lait	négative
Peptonisation du lait	faiblement positive
Liquéfaction de la gélatine	positive
Hydrolyse de l'amidon	faiblement positive.

PREPARATION DE L'ANTIBIOTIQUE

Le streptomyces A-5 pousse bien en culture submergée, agitée et aérée, à 27-29°; le milieu utilisé est le suivant : maltose : 3%; glucose : 1%; farine de soja : 2%, peptone : 1%; K_2HPO_4 : 0,1%; $MgSO_4$,7 H_2O : 0,05%; NaCl : 0,3% et huile de soja : 0,5%.

Il est ajusté à pH :7,0.

Nous avons, d'abord, effectué une préculture sur agitateur alternatif, pendant 44 heures, à 27°.

Cette préculture à ensuite servi a ensemencer un fermenteur contenant 12 litres de milieu : l'ensemencement a été fait dans la proportion de 2,5% (v/v). La culture en fermenteur a été agitée (180 t/m), aérée (12 l/m) et maintenue à 29°. L'activité maximum de l'antibiotique Hikizimycine a été atteinte en 11 jours; Les antibiogrammes ont été faits par la méthode des disques en papier et l'agent bactérien choisi fut Pseudomonas fluorescens.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau III.

T A B L E A U III

Durée de l'incubation (jours)	3	5	7	9	11
Hikizimycine (μg/ml)	0	490	1.500	2.650	3.500
pH	7,5	7,5	7,5	7,7	7,8
Volume du mycelium pour 100ml de milieu (après centrifugation 10 minutes à 3000t/mn)	18	37	37	33	32

ISOLEMENT ET PROPRIETES DE L'HIKIZIMYCINE

L'Hikizimycine a été isolée du milieu de culture de Streptomyces A-5 après centrifugation et chromatographie sur résines échangeuses d'ions et sur charbon activé; il a été purifié sous forme de son bromhydrate.

Après cristallisation dans le mélange éthanol-eau le bromhydrate d'hikizimycine se présente sous forme de cristaux blancs, sans point de fusion défini : début de fusion entre 214-215° pas de changement jusqu'à 300°; $[\alpha]_D^{23°,5} = -40°,6$ (c 1, H_2O)

Le bromhydrate se dissout très facilement dans l'eau, légèrement dans le méthanol et pratiquement pas dans les autres solvants tels que l'acide acétique; la pyridine; l'éthanol; l'acétate d'éthyle et le chloroforme.

Il donne des réactions positives avec le nitrate de cérium et l'acide periodique, légèrement positives avec la ninhydrine. Mais les tests du biuret; de Molisch; de Fehling; d'Ehrlich et du chlorure de fer sont négatifs.

L'antibiotique est homogène par chromatographie sur papier dans différents systèmes (voir figure 1) et par électrophorèse. Il est détecté par fluorescence U.V. et par autobiogramme.

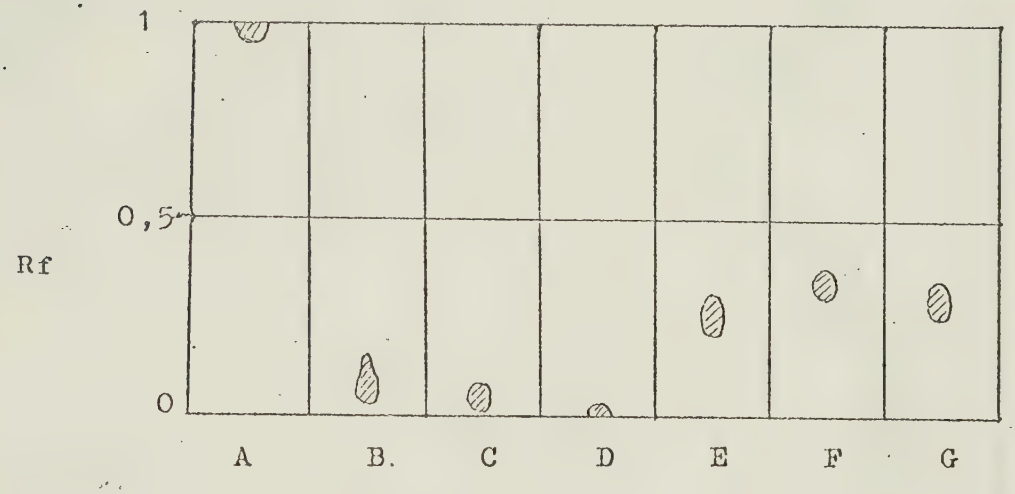
Le spectre U.V. (figure 2) mesuré dans différents solvants, acide, neutre et basique présente des analogies avec celui de la cytosine substituée en position N 1. L'existence de ce groupement est d'ailleurs confirmé par le spectre de R.M.N. (figure 3) qui montre à δ 6,3 et 7,95 deux doublets (2H; $J_{5,6} = 8$ Hz). On n'observe pas de signaux relatifs à des groupements méthyles

Le spectre I.R. (KBr) (figure 4) montre deux bandes, à 3400 et 1675 cm^{-1} attribuables l'une à la présence de nombreux hydroxyles et l'autre à des groupements amido-carbonyles.

FIGURE 1

Chromatographie sur papier de l'hikizimycine

Papier Toyo Roshi N° 51;
Méthode ascendante;
détecté par autobiogramme et U.V.



A NH_4Cl (3%)
B Acétone (50%)
C Phénol (80%)
D n-butanol saturé avec de l'eau
E n-butanol-méthanol-eau : 40ml-20ml-20ml+méthyl-orange (1,5 g)
F n-butanol-acide acétique-eau : 1-1-1
G n-propanol-pyridine-acide acétique-eau : 15-10-3-12

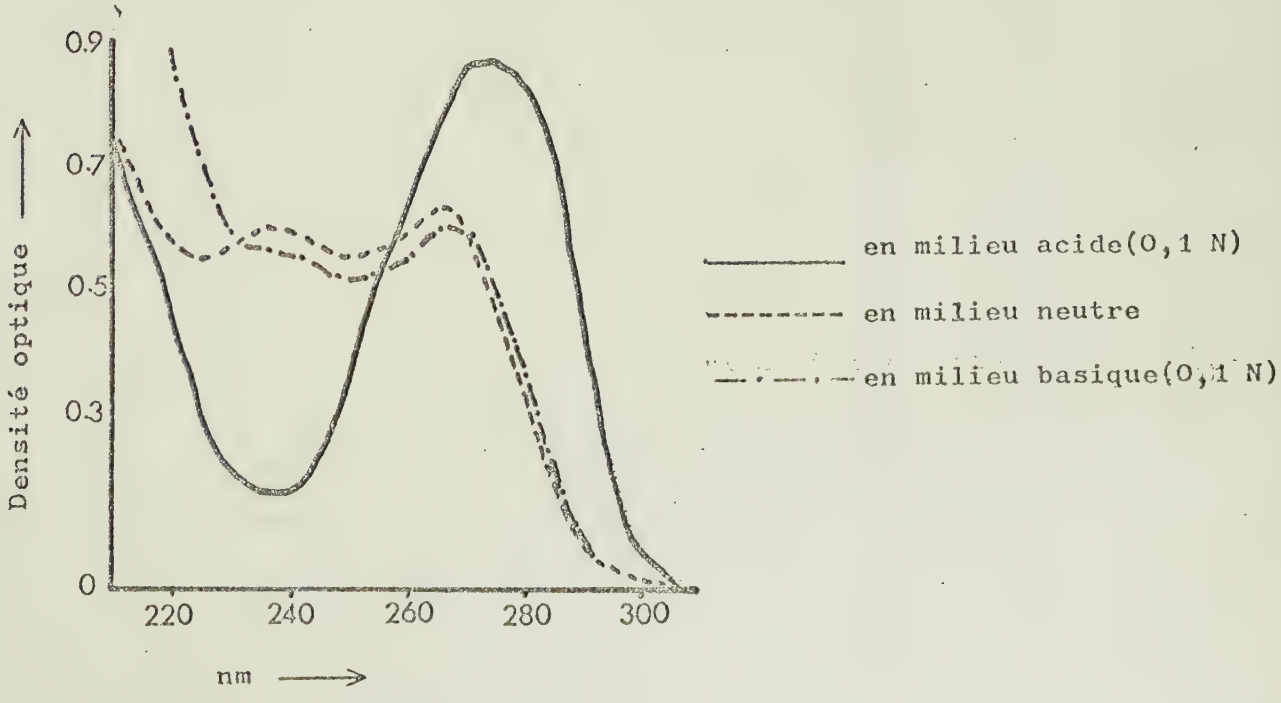


Figure 2 : Spectre U.V. de l'Hikizimycine

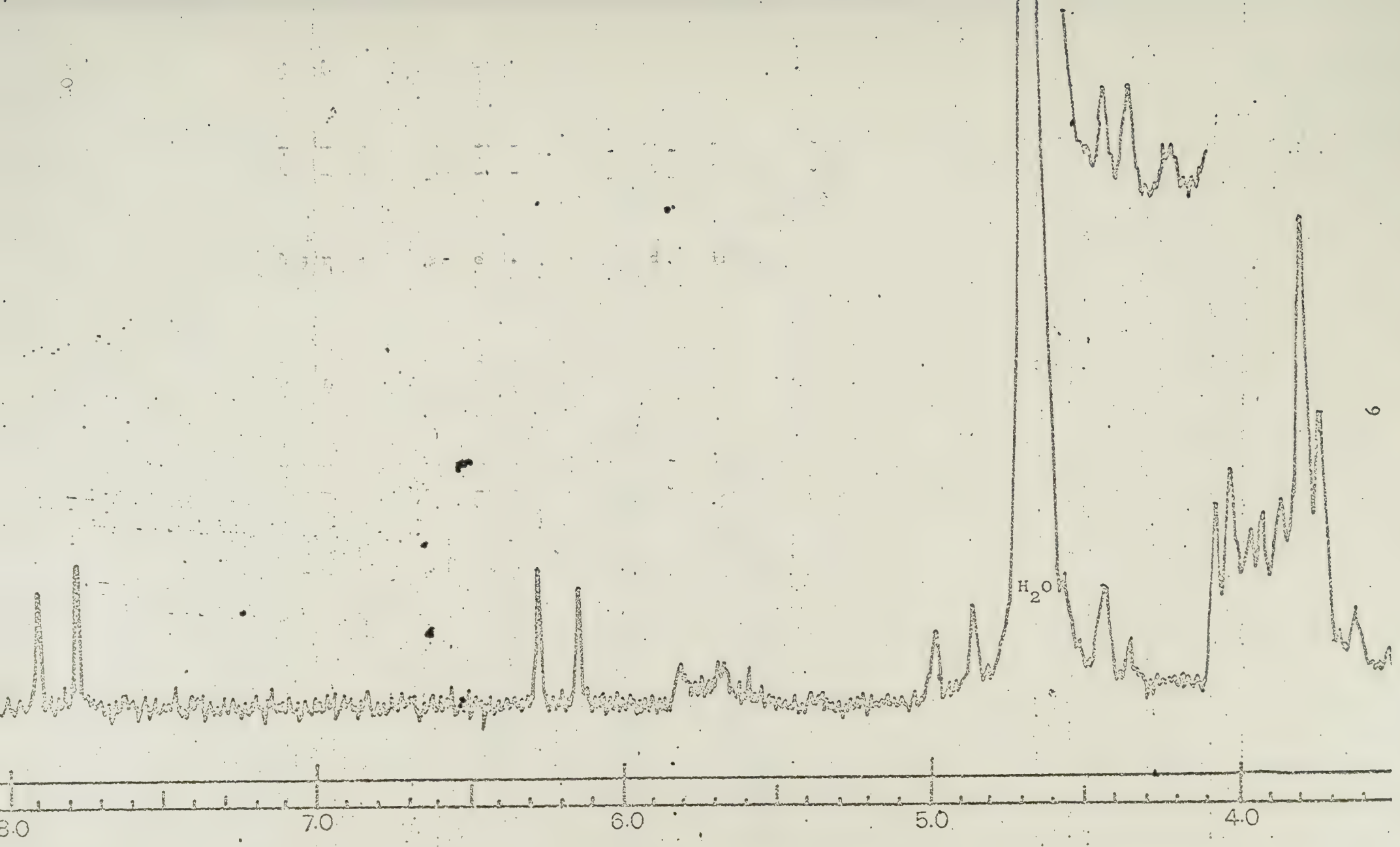


Figure 3 : Spectre R.M.N. (D_2O) de l'Hikizimycine

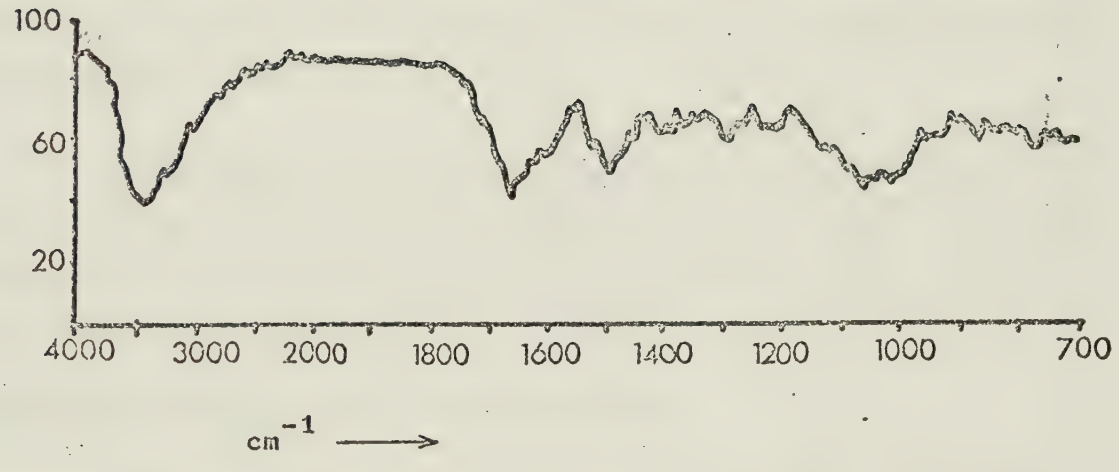


Figure 4 : Spectre I.R. (KBr) de l'Hikizimycine

Le titrage[5] de l'hikizimycine (bromhydrate) a montré deux points de dissociation apparents : pK'a 3,9 et 7,7. Le premier (pH'a 3,9) peut être attribué à celui du groupement amine de la cytosine[6]. Le dernier (pK'a 7,7) correspond à celui du groupement amine des glucides aminés[7-11].

Le résultat du titrage nous permet de calculer le poids moléculaire du bromhydrate : 856.

L'antibiotique est assez stable en milieu acide. Lorsqu'on le laisse dans l'acide chlorhydrique (1M) à15° pendant 6 heures ou lorsqu'on le chauffe à 100° pendant 1 heure, son activité antimicrobienne reste constante.

Par contre, il est moins stable en milieu alcalin. Il est stable dans une solution de soude (1M) à 15° pendant 6 heures, mais, lorsqu'on le chauffe dans le même milieu à 100°, pendant 1 heure, il perd totalement son activité.

Propriétés microbiologiques et biologiques

Nous montrons le spectre antimicrobien dans le tableau IV. Comme on peut le voir, l'antibiotique inhibe peu la croissance des bactéries gram-positives et gram-négatives et des levures, sauf certains Pseudomonas et Xanthomonas. Mais l'antibiotique est efficace contre des champignons, notamment, des champignons phytopathogènes.

En fait, le bouillon filtré contenant l'hikizimycine (concentration : 3 mg/ml) montre un effet thérapeutique in vivo contre les maladies de la plante provoquées par Helminthosporium oryzae, Xanthomonas oryzae et Alternaria kikuchiana mais abime, en même temps, les plantes elles-mêmes.

T A B L E A U IV

SPECTRE ANTIMICROBIEN DE L'HIKIZIMYCINE

Organismes testés	C.M.I.(mcg/ml)	Milieux
Bacillus subtilis	200	nutrient broth
" megaterium	"	" "
Escherichia coli	"	" "
Proteus vulgaris	"	" "
Sarcina lutea	"	" "
Staphylococcus aureus	"	" "
Pseudomonas aeruginosa	100	" "
" tabaci	40	" "
fluorescens	10	" "
syringiae	2	" "
Xanthomonas campestri	200	" "
" oryzae	50	" "
Candida albicans	200	malt agar
" utilis	"	" "
Saccharomyces cerevisiae	"	" "
Aspergillus oryzae	150	" "
" niger	100	" "
Penicillium chrysogenum	80	" "
Trichophyton rubrum	150	gélose de Sabouraud
Alternaria tenius	2	potato glucose agar
Alternaria kikuchiana	1	" " "

Organismes testés	C.M.I.(mcg/ml)	Milieux
Ascochyta sojaecola	2	potato glucose agar
Botrytis cinerae	20	" " "
" tulipae	10	" " "
Curvularia lunata	2	" " "
" geniculatae	10	" " "
Colletrichum linicolum	20	" " "
Fusarium oxysporum	200	" " "
Helminthosporium sativum	10	" " "
" oryzae	100	" " "
Piricularia oryzae	100	" " "
Rhizoctonia solani	10	" " "
Sclerotium bataticola	2	" " "
" rolfsii	20	" " "
Stemphylium lotii	5	" " "
Trichoderma viridi	200	" " "

Nous avons aussi testé la toxicité biologique sur les souris et les poissons. La D.L.50 pour les souris est de 15mg/kg. L'injection intraveineuse de 35mg/kg a fait mourir toutes les souris.

Par contre, nous n'avons pas observé de toxicité nette sur les poissons rouges et les "killifish". Ils peuvent vivre pendant une semaine dans de l'eau contenant de l'hikizimycine (concentration : 1mg/ml).

L'hikizimycine est inactive contre la leucémie L_{1210}.

C H A P I T R E II

STRUCTURE DE L'HIKIZIMYCINE 1

Les résultats des microanalyses de l'hikizimycine et de son bromhydrate ne sont pas satisfaisants et leur caractère peu volatile n'a pas permis d'en obtenir un spectre de masse.

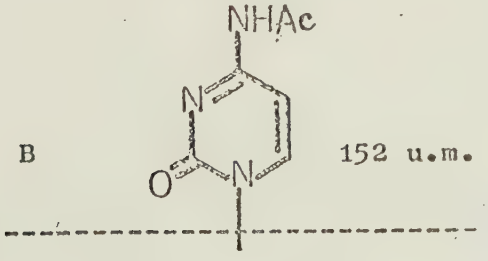
La formule moléculaire de l'hikizimycine a néanmoins pu être établie par la spectrométrie de masse de quelques uns de ses dérivés, comme nous le décrivons par la suite.

Des dérivés principaux de l'hikizimycine ainsi que des produits de dégradation obtenus au cours de l'élucidation de la structure sont présentés dans le schéma 1

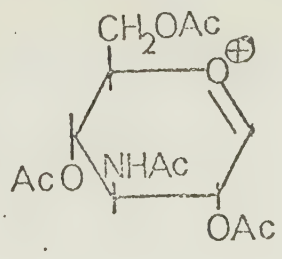
PERACETYLHIKIZIMYCINE 2

L'acétylation de l'hikizimycine 1 fournit le dérivé peracétylé 2 $C_{47}H_{63}N_5O_{27}$, F : 167-172° dont le spectre I.R. ne montre plus de bande OH; par contre, à 1680 cm^{-1}, 1750 et 1220 cm^{-1} des bandes sont visibles, respectivement attribuables à des groupements acétamides et esters. Son spectre de R.M.N. montre des signaux entre 1,80 et 2,40 (39 H), correspondant aux méthyles de 13 groupements acétyles.

Le spectre de masse montre un pic moléculaire à m/e 1129. Le pic à m/e 977 (M-B; voir a) est en accord avec la perte à partir de l'ion moléculaire du groupement N-acétylcytosyle.



a



b m/e 330

Hikizimycine 1

↓ Ac_2O/Pyridine

Peracétylhikizimycine 2

↓ NaOMe/MeOH

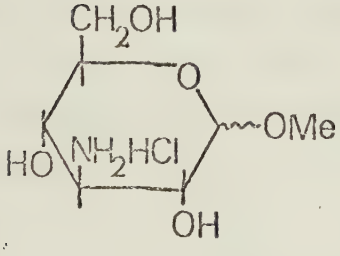
N,N'-Diacétylhikizimycine 3

↓ HCl/MeOH

↓ NaH, CH_3I/DMF

N,N'-Diacétyl-perméthyl-hikizimycine 4

Fragment I 5 et 5'



5 : α-anomère

5' : β-anomère

Fragment II 8

↓ Ac_2O/Pyridine

Dérivé peracétylé 9

↓ NaMe/MeOH

Dérivé N-acétylé 10

↓ NaH, CH_3I/DMF

Dérivé N-acétylé perméthylé 11

Schéma 1

Un pic intense à m/e 154 $(B+2H)^{12}$ confirme aussi la présence de la N-acétylcytosyle. Le pic de base m/e 330 ($C_{14}H_{20}NO_8$) correspond à l'ion oxonium b qui proviendrait d'un groupement de tétra-acétylhexosamine relié au reste de la molécule par une liaison glycosidique.

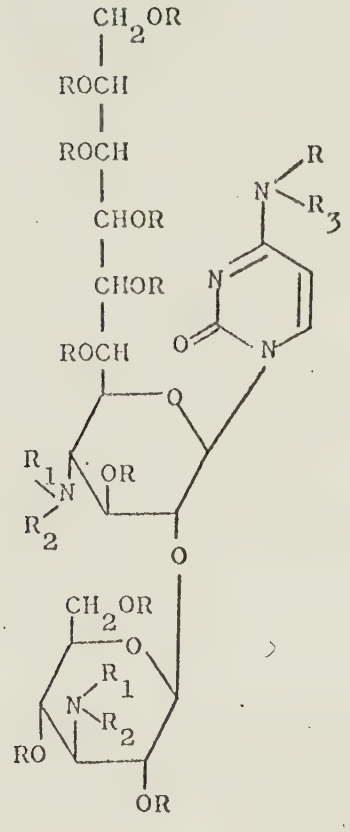
N, N'-DIACETYLHIKIZIMYCINE 3

L'action du méthanolate de sodium sur la peracétylhikizimycine 2 à température ambiante conduit au dérivé N, N'-diacétylhikizimycine 3 $C_{25}H_{41}N_5O_{16}$ F=244-253°, dont le spectre R.M.N. indique la présence de deux groupements N-acétyles (2,12 ppm; 6H).

Le spectre I.R. ne montre plus de bandes esters mais, à 1650 cm^{-1}, une bande est visible, attribuable à un groupement acétamide.

Le spectre u.v. de 3 est identique à celui de l'hikizimycine, ce qui indique que le groupement N-acétyle du noyau pyrimidine (cytosine) a été éliminé au cours de la désacétylation. Cette hypothèse est confirmée par l'expérience suivante : la cytidine peracétylée a pu être complètement désacétylée en cytidine dans les conditions analogues à celles déjà employées lors de la désacétylation de la peracétylhikizimycine 2.

L'existence de deux groupements N-acétyles après désacétylation de la peracétylhikizimycine suggère que la molécule d'hikizimycine contient deux groupements aminés acétylables à l'exclusion du groupement amine de la cytosyle. Les treize groupements acétyles de la peracétylehikizimycine pourraient donc se caractériser comme suit : trois groupements N-acétyles et dix groupements O-acétyles.



1 R = R_1 = R_2 = R_3 = H

2 R = R_2 = Ac; R_1 = R_3 = H

3 R = R_1 = R_3 = H; R_2 = Ac

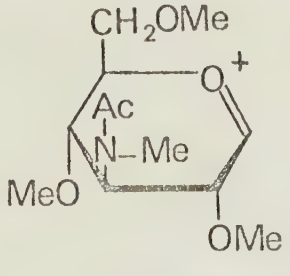
4 R = R_1 = R_3 = Me; R_2 = Ac

FORMULE BRUTE DE L'HIKIZIMYCINE

La méthylation de la N, N'-diacétylhikizimycine 3 par l'iodure de méthyle en présence d'hydrure de sodium dans le N, N'-diméthylformamide[13] livre le dérivé perméthylé 4 dont le spectre de masse montre un pic moléculaire à m/e 863 correspondant à la formule $C_{39}H_{69}N_5O_{16}$ calculée par mesure de masse exacte en haute résolution. Un dérivé perdeutériométhylé a été aussi préparé en utilisant l'iodure de méthyle trideutérié; le spectre de masse de ce composé montre un pic moléculaire à m/e 905. Ces 42 (3x14) unités de masse supplémentaires (905-863) montrent l'introduction de quatorze groupements méthyles au cours de la perméthylation de la N, N'-diacétylhikizimycine 3; douze d'entre eux peuvent être attribués à la méthylation des dix groupements hydroxyles et des deux groupements acétamides de la partie glucidique et deux à la méthylation du groupement amine du noyau cytosine.

La molécule d'hikizimycine contiendrait donc dix groupements hydroxyles et trois groupements amines primaires, ce qui permet de lui attribuer la formule brute : $C_{21}H_{37}N_5O_{14}$ ($C_{39}H_{69}N_5O_{16}$ - $14xCH_2$ - $2xCH_2CO$).

Le spectre de masse de la N, N'-diacétylperméthylhikizimycine 4 présente le pic de base à m/e 260 correspondant à un ion oxonium c qui proviendrait d'un N-acétylhexosamine perméthylé[14].



c m/e 260

METHANOLYSE DE LA N, N'-DIACETYLHIKIZIMYCINE 3

La méthanolyse de la N, N'-diacétylhikizimycine fournit deux fragments principaux :

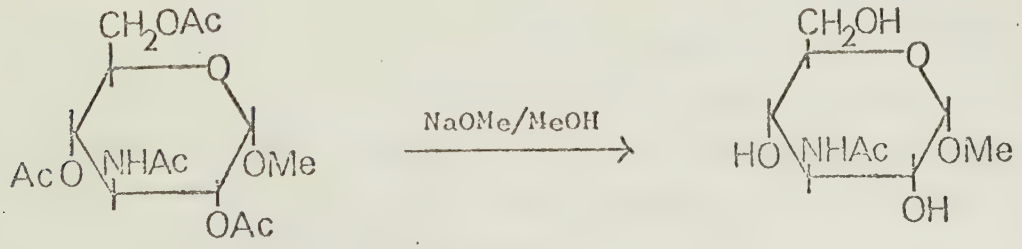
a - le fragment I qui peut être oxydé par le periodate et dont les tests à la ninhydrine et au nitrate d'argent se sont révélés positifs.

b - le fragment II qui présente une forte absorption dans l'u.v. est aussi oxydable par le periodate et montre la même réactivité que le fragment I vis-à-vis des tests caractéristiques des glucides.

STRUCTURE DU FRAGMENT I 5 et 5'

L'analyse du fragment I après purification suggère la formule : $C_7H_{15}NO_5$, HCl, correspondant aux deux méthyl-glycosides (5 et 5') du chlorhydrate d'une hexosamine. Le spectre de R.M.N. de ce produit montre deux doublets situés dans les champs caractéristiques des signaux des protons anomériques dans les proportions : H-équatorial : H-axial = 3 : 1.

L'acétylation du fragment I conduit essentiellement, après purification, au dérivé 6 $C_{15}H_{23}NO_9$, F = 171-175°, dont les différents tests physiques suggèrent que c'est un dérivé de N-acétyl-tri-O-acétyl d'un méthylhexosaminide.



6 7

L'O-désacétylation du produit 6 par le méthanolate de sodium fournit un méthyl-N-acétyl-hexosaminide 7 $C_9H_{17}NO_{16}$. Le spectre de R.M.N. de ce produit montre un doublet à 4,72 ($J_{1,2}$ 3,5Hz, H-1 éq.) situé dans la région des protons anomériques.

Dans le cas des protons anomériques des pyranosides, un proton axial est plus blindé que ce même proton en position équatoriale (H-1ax 4,4-4,5; H-1éq. 4,7-5,5)[15-23]. En outre, la constante de couplage spin-spin entre les protons situés sur les carbones 1 et 2 est de 7 à 9 Hz dans le cas du couplage axial-axial et de 2 à 4 Hz dans le cas du couplage axial-équatorial ou équatorial-équatorial [15-23].

Ces données indiquent que le méthyl-glycoside 7 obtenu est l'α-anomère. Après 24 heures, ce composé ne montre aucune consommation de métaperiodate de sodium (témoins : différents méthyl-acétamido-désoxy-glycosides). Ces résultats suggèrent que le produit 7 est un méthyl-3-acétamido-3-désoxy-aldohexopyranoside.

Enfin, la confrontation des données physiques du composé 6 avec celles d'un échantillon authentique* ainsi que le point de fusion pris sur le mélange permettent d'identifier ce méthyl-peracétyl-hexosaminide 6 comme le méthyl-3-acétamido-2,4,6-tri-O-acétyl-3-désoxy-α-D-glucopyranoside[24,25].

Le 3-amino-3-désoxy-D-glucopyranose serait donc un constituant de l'hikizimycine.

---

* Nous remercions Monsieur le Professeur R.U. Lemieux, de l'Université d'Alberta (Canada), qui a bien voulu nous céder un échantillon authentique de méthyl-3-acétamido-2,4,6-tri-O-acétyl-3-désoxy-α-D-glucopyranoside.

Fragment II 8

H_2/PtO_2, H_2O

Dérivé hydrogéné

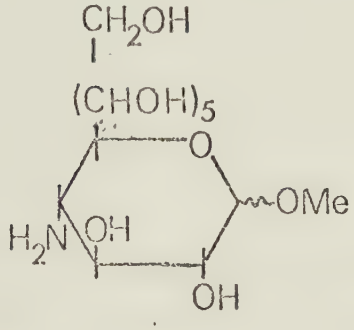
HCl/MeOH

HCl/H_2O

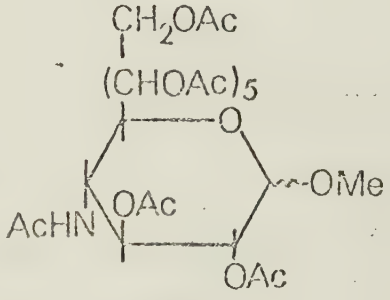
Mélange de méthyl- : hikosaminide 14 et 14'

Tétrahydropyri-midine-2-one 12

Hikosamine 13 (chlorhydrate)



Ac_2O/Pyridine



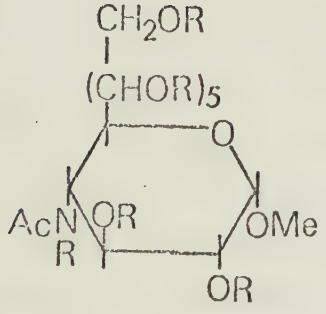
14 : α-anomère

14' : β-anomère

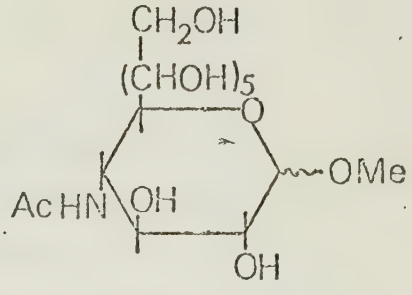
15 : α-anomère

15' : β-anomère

NaMe/MeOH



17 R : Me



16 : α-anomère

16' : β-anomère

Schéma 2

STRUCTURE DU FRAGMENT II 8

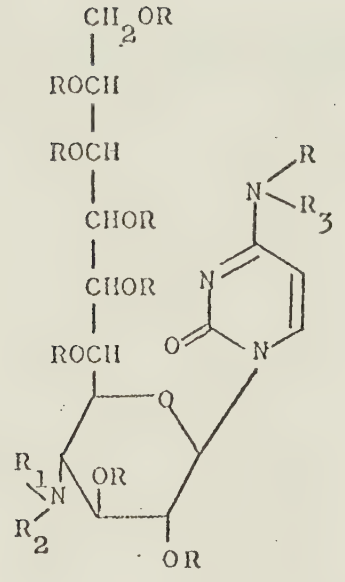
Le spectre de R.M.N. (Fig. 5) du fragment II $C_{15}H_{26}N_4O_{16}$,2HCl 8, F = 181-185° montre à champs faibles deux doublets (6,27 et 7,92; $J_{5,6}$=7,8 Hz) attribuables aux deux protons oléfiniques du noyau cytosine et un signal dû au proton anomérique (5,77; $J_{1,2}$=8,7 Hz) caractéristique de la présence d'une liaison glucidique.

Le spectre I.R. (KBr) montre une large bande OH; aucune bande n'est visible à 1540 cm^{-1} (-NH).

L'acétylation du fragment II fournit un dérivé peracétylé $C_{35}H_{46}N_4O_{20}$, F = 156-159° 9, dont le spectre I.R. ne montre plus de bande OH, mais des bandes esters et acétamides à des longueurs d'ondes déjà signalées pour la peracétylhikizimycine 2. Dix méthyles de groupements acétyles sont visibles entre 1,90 et 2,25 (30 H) sur le spectre de R.M.N.

Le spectre de masse du dérivé 9 met en évidence un pic moléculaire à m/e 842 correspondant à la formule $C_{35}H_{46}N_4O_{20}$; des pics à m/e 690 (M^+-B) et 154 (B+2H) (voir a, page 15) sont compatibles avec la présence d'un nucléoside dont la cytosine serait un constituant.

La désacétylation de 9 par le méthanolate de sodium livre le dérivé N-acétyle 10. Son spectre I.R. montre les bandes du groupement acétamide à 1650 et 1540 cm^{-1}. Dans son spectre de R.M.N., le doublet d'un proton anomérique est observable a 5,69 et le méthyle d'un groupement N-acétyle est visible sous forme d'un singulet a 2,12. Ces conditions de désacétylation impliquent l'hydrolyse simultanée du groupement N-acétyle du noyau pyrimidine; la persistance, après réaction d'un groupement acétamide évoque l'existence d'un glucide aminé.



8 R = R_1 = R_2 = R_3 = H

9 R = R_2 = Ac; R_1 = R_3 = H

10 R = R_1 = R_3 = H; R_2 = Ac

11 R = R_1 = R_3 = Me; R_2 = Ac

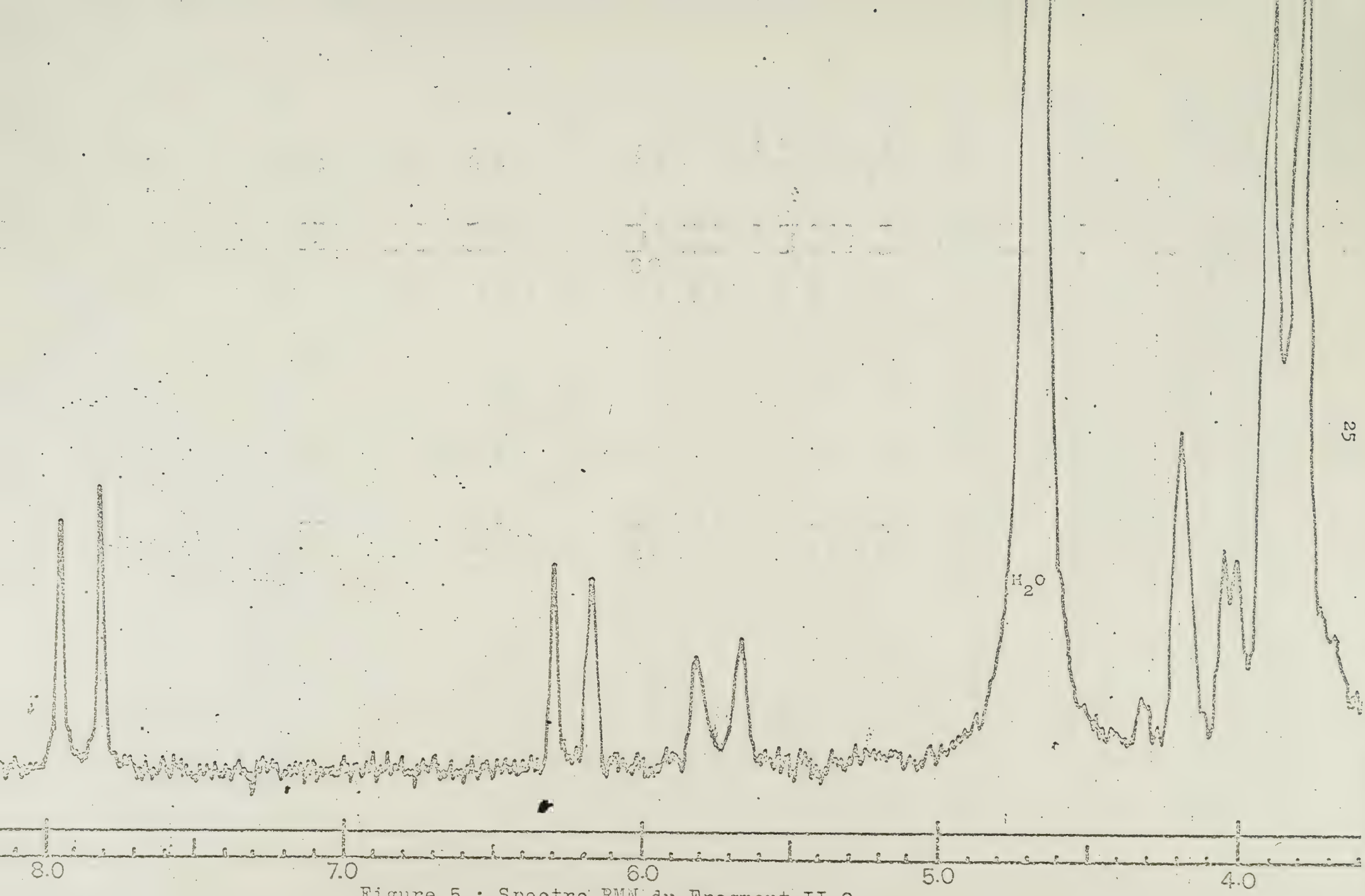


Figure 5 : Spectre RMN du Fragment II 8

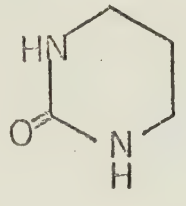
Le spectre de masse du dérivé 11 obtenu après perméthylation du dérivé N-acétylé 10 confirme, par des pics à m/e 618 (M^+) correspondant à la formule $C_{28}H_{50}N_4O_{11}$ et 480 (M^+-B'), l'hypothèse précédemment énoncée.

Ces résultats nous ont amenés à tenter une hydrolyse sur le fragment II nous permettant de caractériser indépendamment de la cytosine le deuxième glucide aminé.

Après hydrogénation (PtO_2) et hydrolyse acide du fragment II on obtient deux composés principaux (Schéma 2) :

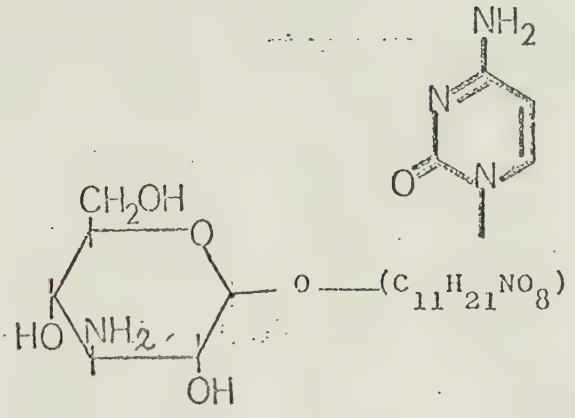
Caractérisation de la tetrahydropyrimidine-2-one

Un des produits a été identifié comme la tétrahydropyrimidine-2-one 12 $C_4H_8N_2O$ (M^+ 100) par confrontation des données spectrales avec celles d'un échantillon authentique préparé à partir de la cytidine, selon la méthode d'Iwasaki[27]; de même, le point de fusion et le spectre I.R. du picrate de la tétrahydropyrimidine-2- sont identiques à ceux du picrate d'un échantillon authentique.



12

Un reste cytosine est donc présent dans l'hikizimycine dont la structure partielle pourrait être représentée par 1a.



1a

Le deuxième produit obtenu de l'hydrolyse du fragment II a été nommé "hikosamine" alors que sa structure n'était pas encore élucidée. Afin d'en faciliter l'étude, il a été isolé sous forme de son méthyle glycoside par hydrogénation suivie de méthanolyse du fragment II (Schéma 2).

Structure de l'hikosamine

La méthanolyse fournit, outre du produit hydrogéné inchangé, deux méthyl-glycosides de l'hikosamine 14 et 14' : $C_{12}H_{25}NO_{10}$.

Les deux anomères ont pu être séparés après acétylation (15 et 15'). La distinction entre le méthyl-α-hikosaminide et le méthyl-β-hikosamidine n'a pu être faite qu'à partir du spectre R.M.N. des produits O-désacétyles 16 et 16' :

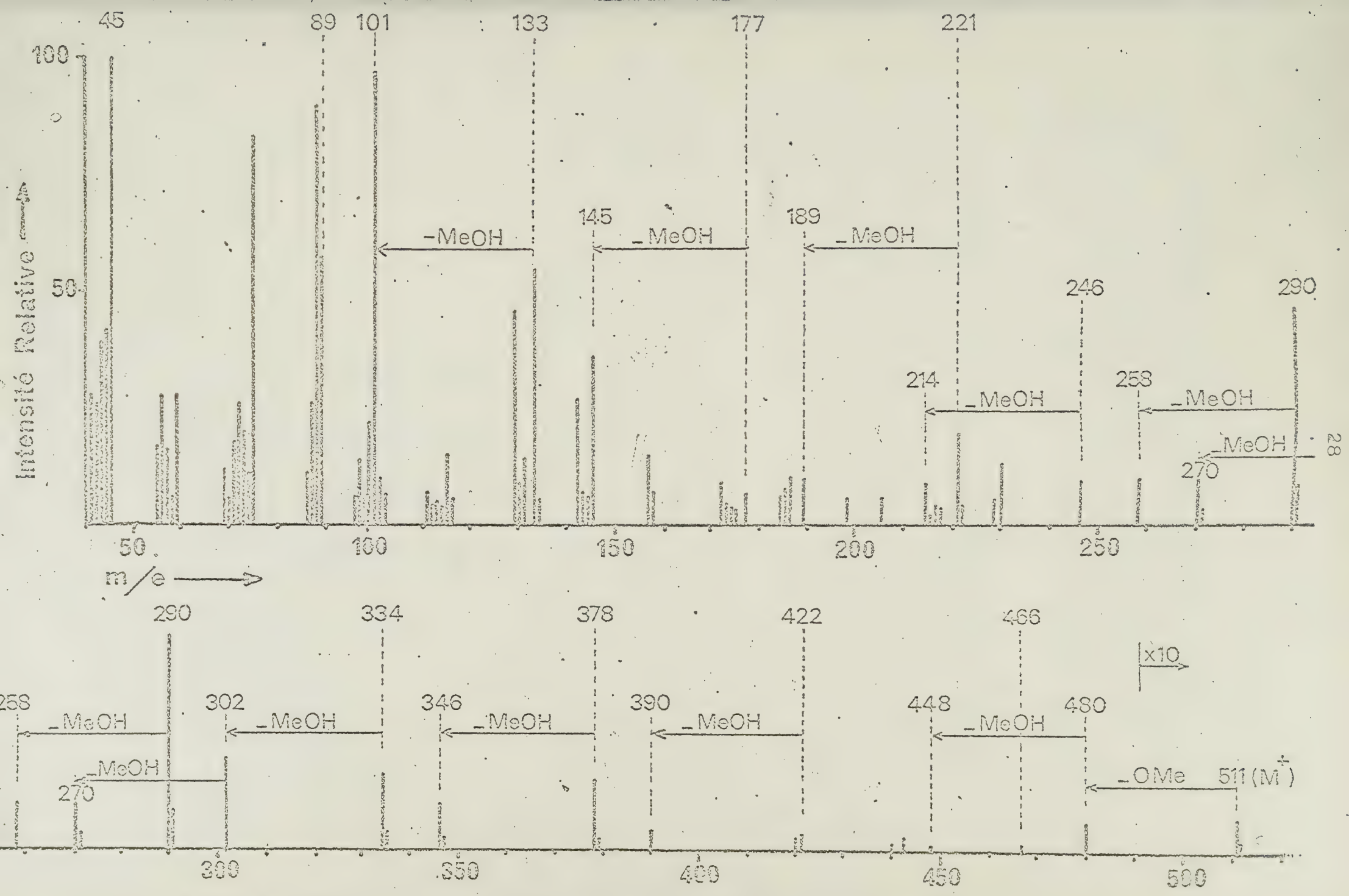


Figure 6 : Spectre de masse du méthyl-N-acétyl-N,O-perméthylhikosaminide 17

Le spectre de R.M.N. du méthyl-N-acétyl-β-hikosaminide 16 présente, à 4,41 ($J_{1,2}$ 8 Hz; H-1ax), un doublet caractéristique d'un proton anomérique α, alors que le spectre de R.M.N. du méthyl-N-acétyl-α-hikosaminide 16 présente ce même signal à 4,92 ($J_{1,2}$ 3 Hz; H-1éq.) suggérant pour le proton anomérique une configuration β.

Le spectre de masse (Fig. 6) du méthyl-N-acétyl-α-hikosaminide après perméthylation montre un pic moléculaire à m/e 511 ($C_{23}H_{45}NO_{11}$) et à m/e 480 (M^+-31) un pic intense correspondant à la perte du groupement méthoxyle anomérique : en effet, après perdeutériométhylation du méthyl-N-acétyl-α-hikosaminide 16 on retrouve sur le spectre de masse de ce dérivé (M^+ 538) un pic à m/e 507 (M-31) correspondant à la perte du groupement méthoxyle préexistant.

Deux séries de pics sont également visibles sur le spectre de masse (Fig. 6). La signification des fragmentations correspondantes a été interprétée comme figurée sur le schéma 3. Cette interprétation a été confirmée par comparaison avec le spectre de masse du produit perdeutériométhylé; elle est compatible avec la structure 17 suggérée pour le méthyl-N-acétyl-perméthyl-α-hikosaminide.

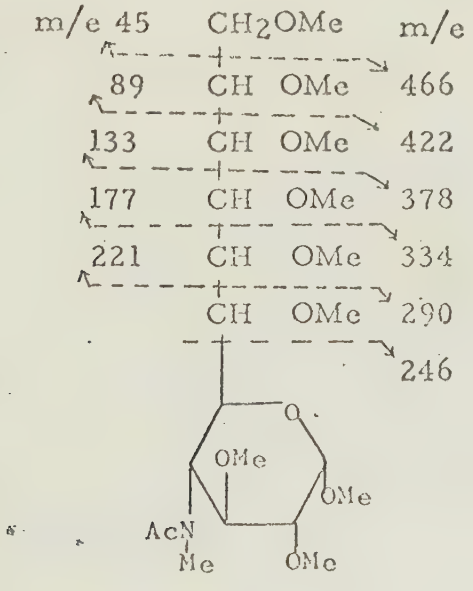
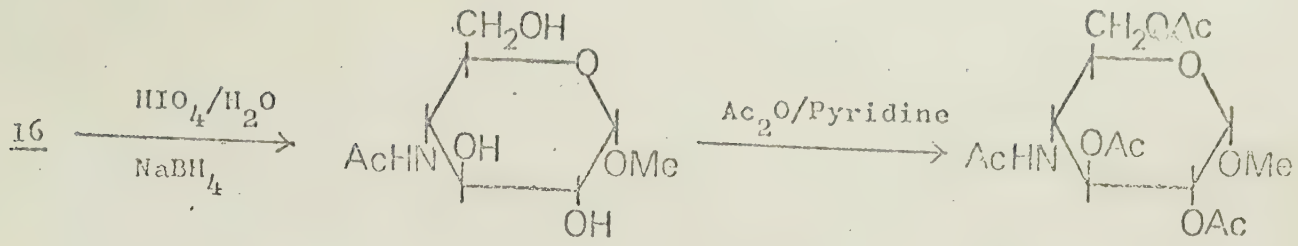
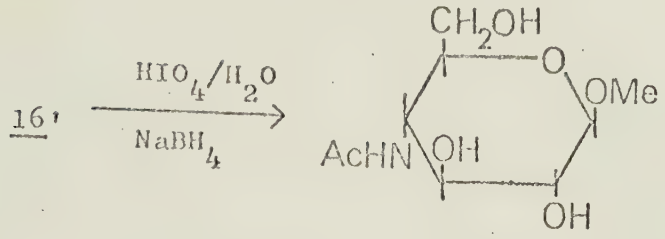


Schéma 3



18 . 19



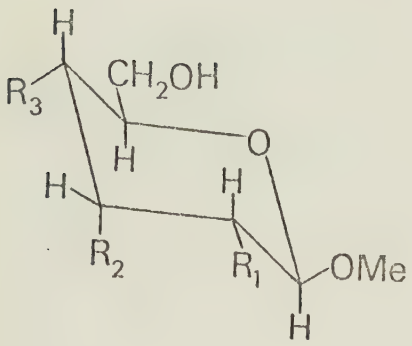
18'

La mise en évidence du dérivé perméthylé 17 de la méthyl-N-acétyl-α-hikosaminide rend compte des onze carbones manquants de la formule de l'hikizimycine (voir 1a, page 27).

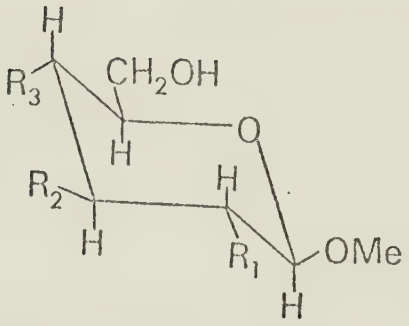
La position du groupement aminé encore indéterminée a été établie par oxydation périodique du méthyl-N-acétyl-α-hikosaminide 16 : cinq moles de periodate sont immédiatement consommés et une mole supplémentaire au bout de trois heures; ceci indique la présence d'une chaîne hexitol et de deux groupements hydroxyles vicinaux de configuration trans dans un cycle pyranoïde.

IDENTIFICATION DU METHYL-4-ACETAMIDO-2,3,6-TRI-O-ACETYL-4-DESOXY-α-D-GLUCOPYRANOSIDE

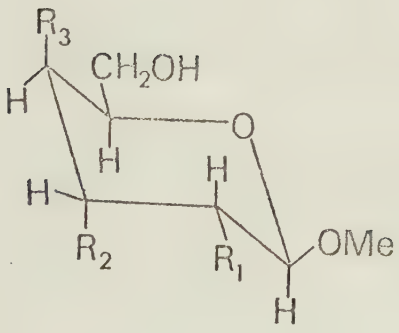
L'oxydation sélective suivie de la réduction[28] respectivement effectuées sur les anomères 16 et β 16' par borohydrure de sodium livrent la méthyl-N-acétyl-α-hexosaminide 18 et la méthyl-N-acétyl-β-hexosaminide 18' dont les spectres de R.M.N. permettent de déterminer la configuration au niveau du carbone anomère : la constante de couplage du proton anomérique du β-anomère 18' ($J_{1,2}$ = 8 Hz) suggère [15-23] pour H-1 et H-2 une orientation axiale-axiale. Les configurations allo-, gluco-, gulo- et galacto- peuvent donc être seules envisagées (voir schéma 4).



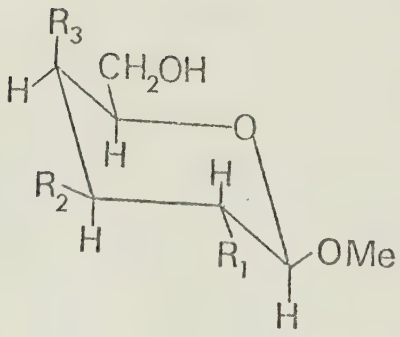
allo



gluco



gulo



galacto

Schéma 4

La consommation, au bout de trois heures, d'une seule mole de periodate au cours de l'oxydation des deux méthyl-N-acétyl-hexosaminides 18 et 18' précédemment obtenues élimine pour le groupement aminé la position 3 et indique la présence de deux groupements hydroxyles vicinaux.

Dans le cas d'une amine portée par le carbone-2, une configuration gluco- ou gulo- serait impliquée par la position trans des groupements hydroxyles vicinaux, possibilité exclue par la comparaison des pouvoirs rotatoires et des points de fusion des deux anomères 18 et 18' avec ceux des méthyl-2-acétamido-2-désoxy-gluco- ou gulo-pyranosides.

L'hexosamine est donc un 4-amino-4-désoxyhexose de configuration gluco- ou galacto- (voir schéma 4).

La comparaison[29] de l'α-anomère acétylé 19 $C_{15}H_{23}NO_9$, F = 142-142,5°, $[\alpha]_D^{20}$ +142,0° ($CHCl_3$) avec un échantillon authentique* permet d'identifier celui-là comme le méthyl-4-acétamido-2,3,6-tri-O-acétyl-4-désoxy-α-D-glucopyranoside.

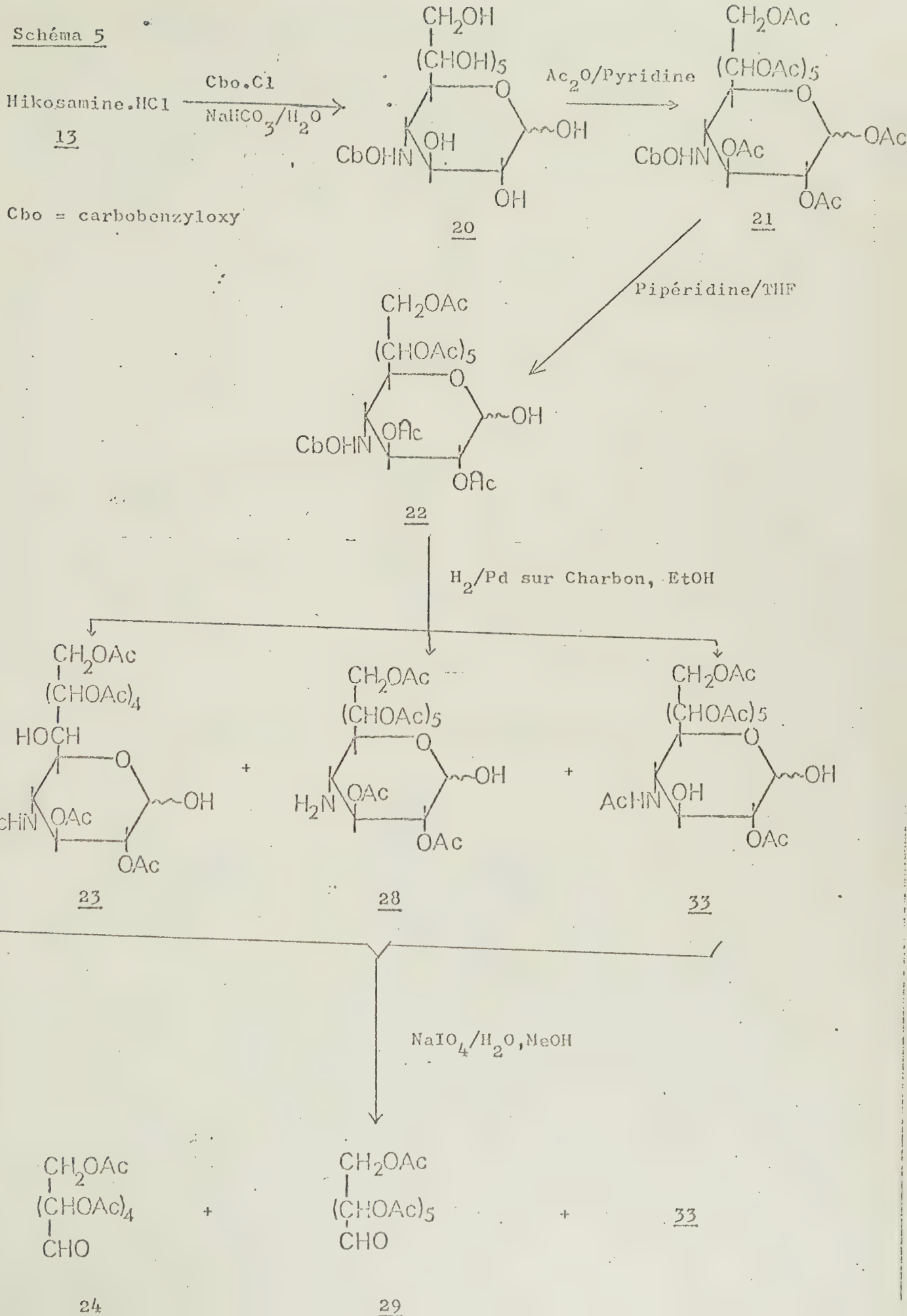
CONFIGURATION DE LA PARTIE ACYCLIQUE DE L'HIKOSAMINE

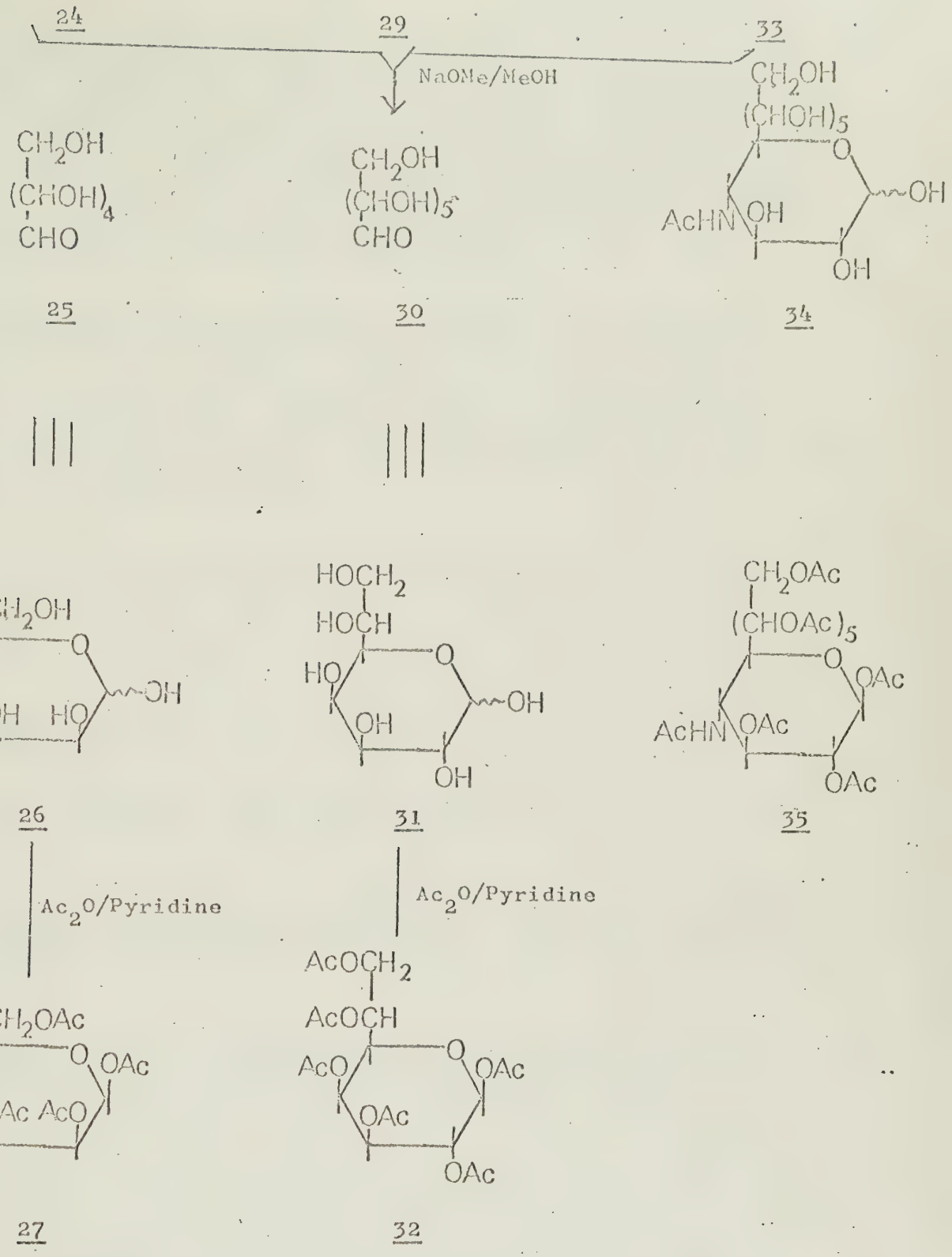
La configuration de la partie hexitol acyclique de l'hikosamine restait à déterminer : l'hydrolyse acide, après hydrogénation du fragment II fournit le chlorhydrate d'hikosamine 13. Par action du chlorure de carbobenzyloxy dans l'eau[30], le N-carbobenzyloxy-hikosamine 20 a pu être obtenu. Après acétylation, le spectre de masse de ce dérivé 21 montre un pic à m/e 781 (M^+-60). Aucune bande OH n'est visible sur le spectre I.R.; des signaux correspondant à neuf méthyles de groupements acétates sont visibles sur le spectre de R.M.N.

---

* Nous remercions M. S.D. Gero et Melle A. Sépulchre d'avoir bien voulu nous céder un échantillon du produit authentique.

Schéma 5


Hikosamine.HCl
13
Cbo.Cl
NaHCO3/H2O
20
Ac2O/Pyridine
21
Cbo = carbobenzyloxy
Pipéridine/THF
22
H2/Pd sur Charbon, EtOH
23
28
33
NaIO4/H2O,MeOH
24
29
33


24
29
33
NaOMe/MeOH
CH2OH
(CHOH)4
CHO
CH2OH
(CHOH)5
CHO
CH2OH
(CHOH)5
O
OH
AcHN
OH
OH
25
30
34
CH2OH
O
HO
OH
HO
OH
HOCH2
HOCH
HO
O
OH
OH
OH
CH2OAc
(CHOAc)5
O
OAc
AcHN
OAc
OAc
26
31
35
Ac2O/Pyridine
Ac2O/Pyridine
CH2OAc
O
OAc
AcO
OAc
AcO
AcOCH2
AcOCH
AcO
O
OAc
OAc
OAc
27
32

La désacétylation* sélective en position 1 (composé 22) par la pipéridine dans le tetrahydrofurane[31] suivie de décarbobenzyloxylation par hydrogénolyse fournit un mélange dont le spectre I.R. montre une bande à 1535 cm^{-1} (>NH) suggérant la migration[34] d'un groupement acétyle; celle-ci pourrait se faire à partir du carbone 6 ou du carbone-3 sur l'amine en 4 (Schéma 5).

Après décarbobenzyloxylation, le mélange des produits 23, 28 et 33 obtenus est oxydé par le periodate sans purification préalable, puis désacétylé. Après purification et peracétylation, chacun des trois dérivés 27, 32 et 35 (voir schéma 5)est caractérisé par spectrométrie de masse.

L'étude des spectres de masse des produits purifiés et peracétylés permettent de caractériser les trois produits comme :

(i) un hexose peracétylé 27 (M^+-59 à m/e 331);

(ii) un heptose peracétylé 32 (M^+-59 à m/e 403);

(iii) l'hikosamine peracétylé 35 (M^+-59 à m/e 690).

(I) le premier produit a pu être identifié comme le D-mannose ou son énantiomorphe par chromatographie sur papier dans différents solvants.[35-39]

Son pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20°}$ + 10°,3 permet de lui attribuer la configuration D(D-mannose = +14°,2; L-mannose = -14°,0).

---

* La méthode de Whitaker et coll.[32] (pour le méthanolate de magnésium dans le méthanol à 0°C) et celle de Micheel et coll.[33] (le méthanolate de sodium dans le méthanol à température ambiante) n'ont pas donné de résultats satisfaisants. La désacétylation a été contrôlée par le phtalate acide d'aniline (pour le pouvoir réducteur), par chromatographie sur couche mince et par la perte d'un groupement acétyle sur le spectre de R.M.N.

(ii) L'heptose obtenu, compte tenu de la configuration D-manno des carbones 3 à 6, ne peut être que D-glycéro-D-galacto-heptose ou son épimère en position 2, le D-glycéro-D-talo-heptose. La comparaison des valeurs de R_f par chromatographie sur papier[40] des différents heptoses confirme qu'il s'agit en fait du D-glycéro-D-galacto-heptose 31. Les spectres I.R. et R.M.N. de son dérivé acétylé 32 $C_{19}H_{26}O_{13}$ α_D^{20} + 50°,7 (c 1,2; $CHCl_3$) Littérature $[\alpha]_D$ = +36,0 (c 0,5; $CHCl_3$) sont superposables avec ceux d'un échantillon authentique.*

Nous avons ainsi déterminé que la partie pyranoidique de l'hikosamine a la configuration 4-amino-4-désoxy-D-glucopyrano- et que la partie hexitol acyclique a la configuration D-glycéro-D-galacto-. Par conséquent, l'hikosamine est le 4-amino-4-désoxy-D-glycéro-D-Galacto-D-glucoundécopyranose.

La mise en évidence du noyau cytosine (précédemment décrit; voir P. 26) et ces derniers résultats nous permettent de proposer une structure 8 pour le fragment II (hikosaminylcytosine). La configuration β de la liaison glycosidique entre l'hikosamine et la cytosine est établie par l'étude des spectres de R.M.N. de l'hikosaminylcytosine et de l'hikizimycine.

LOCALISATION DE LA LIAISON DES FRAGMENT I (3-amino-3-déoxy-D-glucopyranose) ET FRAGMENT II (hikosaminylcytosine)

Afin d'achever la structure de l'hikizimycine la position de la liaison entre les différents constituants restait à déterminer. La localisation de la liaison cytosine-hikosamine (Fragment II) est simultanément prouvée par le spectre u.v. de l'hikizimycine, par l'examen du spectre de masse de l'antibiotique peracétylé 2 (M^+-B à m/e 977; voir P. 15); et par les produits obtenus lors de l'hydrolyse de fragments II hydrogénés.

---

* Nous remercions M. L. Szabo d'avoir bien voulu nous offrir ce produit.

Quant à la position de la liaison entre l'hikosaminyl-cytosine 8 (Fragment II) et 3-amino-3-déoxy-D-glucose (Fragment I), rappelons en premier lieu que les carbones 4 et 3" sont porteurs de fonctions amines acétylables; les résultats déterminants ont été cependant déduits d'oxydation périodique; en effet, en présence de periodate la chaîne acyclique de l'hikizimycine 1 justifie la consommation immédiate de cinq moles de réactifs, ce qui exclut une liaison à ce niveau de la molécule; l'absorption d'une mole supplémentaire entre la première 1/2 heure et 1 heure serait dûe aux positions vicinales d'un OH sur le carbone 3 et d'une fonction amine sur le carbone 4; la consommation de deux autres moles de la troisième à la vingt-quatrième heure serait significative des positions et des orientations de deux fonctions alcool en 2" et 4", et d'une fonction amine en 3". Ces résultats suggèrent que la liaison glycosidique se situerait sur le carbone 1 du 3-amino-3-déoxy-D-glucopyranose et sur la position 2 de l'hikosaminylcytosine (voir TABLEAU V)

La consommation au bout de 15 minutes de cinq moles de periodate par le N, N'-diacétyl-hikizimycine 3, puis l'arrêt total de cette consommation est en accord avec l'interprétation ci-dessus.

CONFIGURATION DES DEUX LIAISONS GLYCOSIDIQUES DE L'HIKIZIMYCINE

Les configurations anomériques de deux glucides aminés ont été déterminées par l'étude des spectres de R.M.N. de l'hikizimycine et de l'hikosaminylcytosine.

Le spectre de R.M.N. de l'hikizimycine dans D_2O montre (Fig. 3) deux doublets attribuables à deux protons anomériques a δ 5,79 ($J_{1,2} = 8,8$ Hz) et δ 4,98 ($J_{1"2"} = 8,0$ Hz, après le déplacement du pic de l'eau), tandis que le spectre de l'hikosaminylcytosine 8 (Fig. 5) montre un doublet à δ 5,75 ($J_{1,2} = 8,8$ Hz). Ce fait nous permet d'attribuer le premier au proton anomérique de l'hikosamine et l'autre à celui du 3-amino-3-désoxy-D-glucopyranose. Les grandes constantes de couplage ($J_{1,2} = 8,8$ Hz, $J_{1"2"} = 8,0$ Hz) de deux protons anomériques sont seulement possibles dans le cas d'orien-

TABLEAU V

OXYDATION PERIODIQUE[+]

Composé	moles de periodate consommées en :						
	5 min	15 min	30 min	1h	2h	3h	24h
Méthyl N-acétyl-α-hikosaminide 16	5,1		5,1	5,1 (4,1)[++]		5,8	5,9 (3,9)
Hikizimycine 1		5,2	5,4	6,2		7,6	8,1
Hikizimycine[+++] 1						7,1 (4,2)	7,8 (4,1)
N,N-diacétylhikizimycine 3		5,2				5,0	5,2
Hikosaminyl-cytosine 8 (Fragment II)		5,9	6,2	6,4	6,9	6,7	7,8
Méthyl-α-D-glucopyranoside					1,6	2,1	3,3

[+] L'échantillon (de l'ordre de 1-2 mg) a été oxydé, à température ambiante et à l'obscurité, par une solution de métaperiodate de sodium dans l'eau fraîchement distillée. La consommation de periodate a été déterminée par la méthode de Müller-Friedberger[26].

[++] Les chiffres entre parenthèses représentent les moles d'acide formique formées.

[+++] Pour l'hikizimycine, nous avons, afin de confirmer les résultats, répété l'expérience en prenant un échantillon de 10 mg.

tations diaxiales sur le cycle pyranoïde pour H-1 et H-2[15-23].

Puisque ces deux glucides aminés ont une D-gluco-configuration (orientation axiale pour H-2), leurs protons anomériques respectifs ont des configurations α (orientation axiale) dans une conformation C1 et, par conséquent, leurs liaisons glycosidiques sont de configuration β.

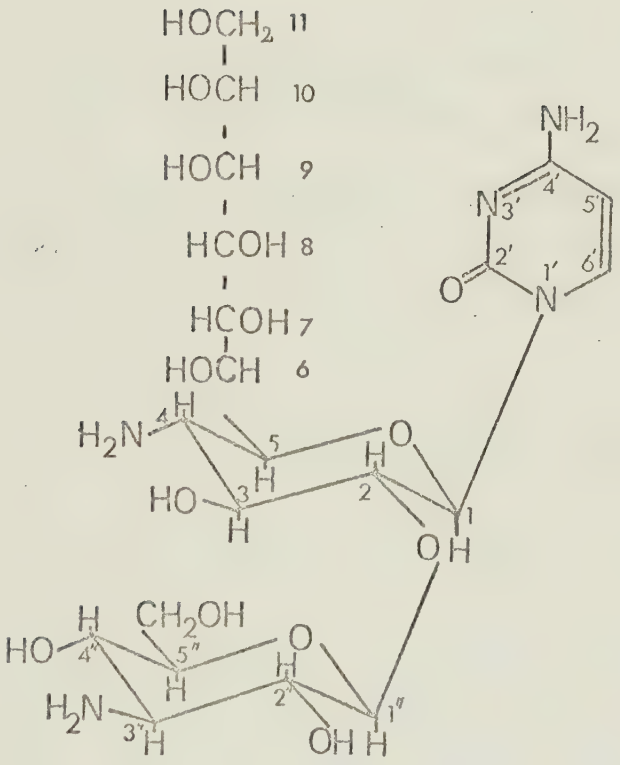
Les pouvoirs rotatoires moléculaires des dérivés N-acétylé et peracétylé prouvent aussi que les liaisons glycosidiques sont β. Les rotations moléculaires de ces dérivés et celles de chaque anomère des constituants halosides sont consignées dans le tableau VI. Nous avons, premièrement, comparé le $[M]_D$ +800° de la N-acétyl-hikosaminylcytosine avec les $[M]_D$ des méthyl-N-acétyl-α- et β-hikosaminides, qui sont, respectivement, + 37.700° et + 700°. Ceci indique une configuration β dans l'hikosaminylcytosine. Mais les résultats ne permettent pas de définir la configuration α ou β dans le cas du dérivé peracétylé. Le même procédé confirme la configuration β pour la liaison glycosidique du 3-amino-3-désoxy-D-glucopyranose avec l'hikosaminylcytosine.

L'ensemble de ces résultats conduit à envisager la structure 1A pour l'Hikizimycine.
L'Hikizimycine est le premier exemple d'un antibiotique ayant à la fois comme constituants un reste cytosine et 3-amino-3-désoxy-D-glucose (=kanosamine). Outre leur présence, celle d'un sucre aminé en onze carbones dans la molécule de cet antibiotique est à signaler comme un nouveau caractère structural.

T A B L E A U VI

Composés	$[M]_D$
N-acétylhikosaminylcytosine 10	+ 800°
Méthyl-N-acétyl-α-hikosaminide 16	+ 37.000°
Méthyl-N-acétyl-β-hikosaminide 16'	+ 700°
Peracétyl-hikosaminylcytosine 9	+ 38.900°
Méthyl-peracétyl-α-hikosaminide 15	+ 61.300°
Méthyl-peracétyl-β-hikosaminide 15'	+ 11.300°
N,N'-diacétylhikizimycine 3	- 6.700°
N-acétyl-hikosaminylcytosine 10	+ 800°
Méthyl-3-acétamido-3-déoxy-α-D-glucopyranoside	+ 32.100°
Méthyl-3-acétamido-3-désoxy-β-D-glucopyranoside	- 6.000°
calculé pour la configuration β+	- 5.200°
Peracétylhikizimycine 2	+ 35.900°
Peracétyl-hikosaminylcytosine 9	+ 38.900°
Méthyl-3-acétamido-2,4,6-tri-O-acétyl-3désoxy--α-D-glucopyranoside	+ 37.100°
Méthyl-3-acétamido-2,4,6-tri-O-acétyl-3-désoxy--β-D-glucopyranoside	- 7.300°
calculé pour la configuration β+	+ 31.600°

+Ce calcul est une application de la règle de Klyne[41], en utilisant les valeurs de la N-acétylhikosaminylcytosine 10 et de la peracétyl-hikosaminyl-cytosine 9 au lieu de celles de l'aglycone libre. Cette règle est appliquée dans le cas des dihalosides 1,1-liés par Stanek[42] et Ganguly et coll.[43]



1A

C H A P I T R E III

DISCUSSION

La première publication sur les nucléosides antibiotiques concernant la Cordycépine est faite en 1950 par Cunningham et coll.[44] Depuis cette date, il a été trouvé dans la nature 34 antibiotiques nucléosidiques ainsi que leurs analogues structuraux.

En 20 ans, la tendance principale de la recherche dans ce domaine a évolué; cette évolution s'est faite en trois étapes.

Entre 1950 et 1960, la recherche est axée principalement sur la détermination des structures chimiques et sur les tests antimicrobiens; la synthèse en est à ses débuts.

Les années suivantes; les ressemblances structurales des nucléosides antibiotiques avec les nucléosides (provenant des acides nucléiques) ont amené les chercheurs à entreprendre l'étude de leur mécanismes d'action et de leur biosynthèse.

A l'heure actuelle; l'action inhibitrice de ces substances sur certains systèmes enzymatiques est étudiée.

Leur utilisation clinique n'est pas encore bien développée pour deux raisons :

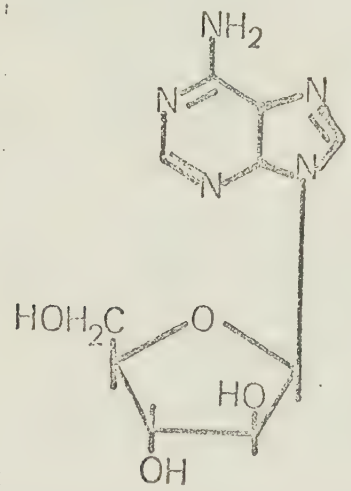
1) - les toxicités sont relativement élevées
2) - ces produits deviennent peu efficaces *in vivo*, à cause de la présence de substances antagonistes.

Mais deux antibiotiques (la Blasticidine S et les Polyoxines) sont utilisés commercialemment contre les champignons phytopathogènes.

On peut classer ces substances (nucléosides antibiotiques, nucléosides non antibiotiques et leurs analogues) selon la nature de chacun des groupements chimiques qui les constituent : partie aglycone, partie glucidique.

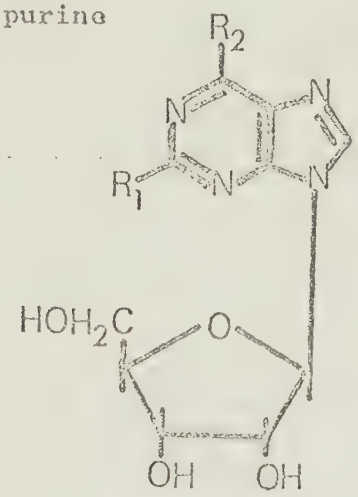
I - Nucléosides puriques et dérivés

1) Arabinofuranosylpurine



1 spongoadénosine (S. antibioticus)[+] [45-47]

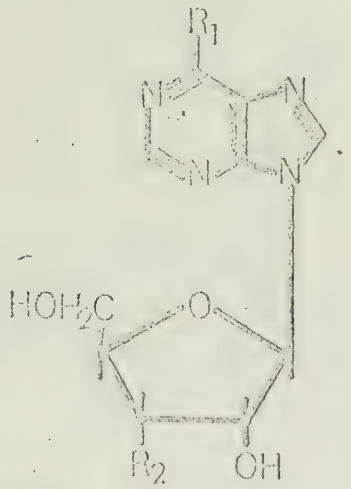
2) Ribofuranosylpurine



2	R_1 : OCH_3	R_2 : NH_2	Spongosine [++]	(Cry. crypta) [48,49]
3	: H	: H	Nébularine [++]	(Ag.nebularis ; S. yokosukaensis) [50,51]
4	: OH	: NH_2	Crotoniside [++]	(Cro. tiglium) [52]

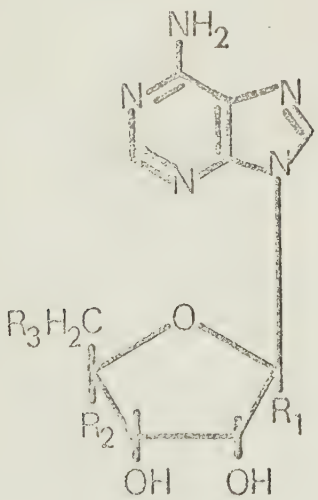
[+] Les souches qui élaborent les produits sont notées entre parenthèses
Les abréviations utilisées pour les souches sont :
Ag : Agaricus; As : Aspergillus; Cor. Cordyceps; Cro : Croton
Cry : Cryptotethia; H : Helminthosporium; N : Nocardia ;
S : Streptomyces; S' : Streptoverticillium

[++] Ces nucléosides ne montrent pas d'activité antibiotique, mais ils sont inclus ici, car ce sont des substances naturelles et ils sont liés structuralement aux nucléosides antibiotiques.

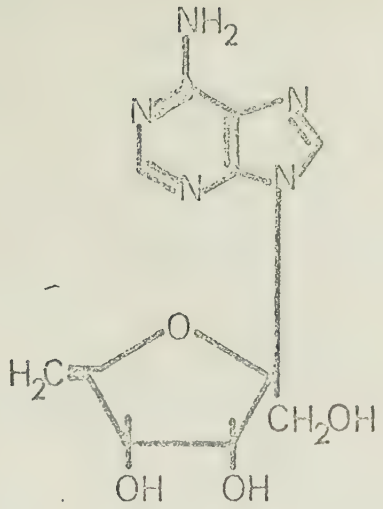


5	R_1 : NH_2	R_2 : H	Cordycépine (Cor. militaris, As. nidulans)[44,53, 54]		
6	: NH_2	: NH_2	3'-Amino-3'-désoxyadénosine [55-57] (Helminthosporium, Cor. militaris, As. nidulans)		
7	: NH_2	: AcNH	3'-Acétamido-3'-désoxyadénosine[++] (Helminthosporium)[58]		
8	: Me_2N	: p-Méthoxy-L-β-phénylalanylamino (S. alboniger) [59]		Puromycine	
9	: NH_2	: L-Homocitrullylamino (Cor. militaris)[60]		Homocitrullylaminoadénosine	
10	: NH_2	: L-Lysylamino (Cor. militaris)[61]		Lysylaminoadénosine	

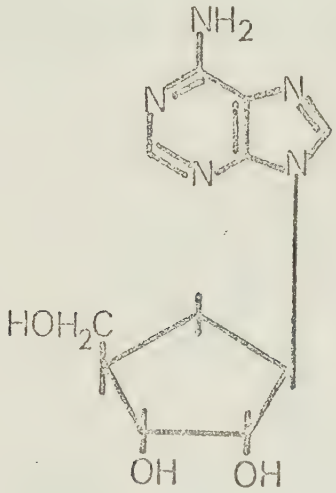
3) - Modification de la partie glucidique



11	R_1 : H	R_2 : F	R_3 : NH_2SO_2O	Nucléocidine (S. Clavus) [62-64]	
12	: CH_2OH	: H	: OH	ou	Angustmycine C / Psicofuranine (S.hygroscopicus)[65,66]

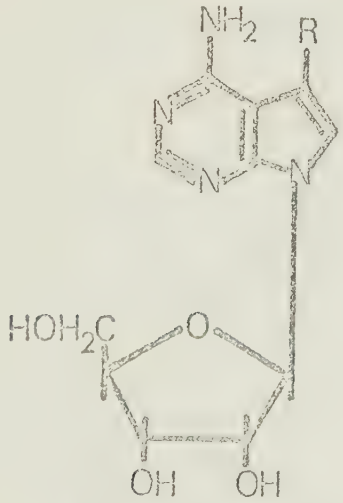


13 Angustmycine A ou Décoynine (S. hygroscopicus)[67,68]



14 Aristéromycine (S. citricolor)[69-71]

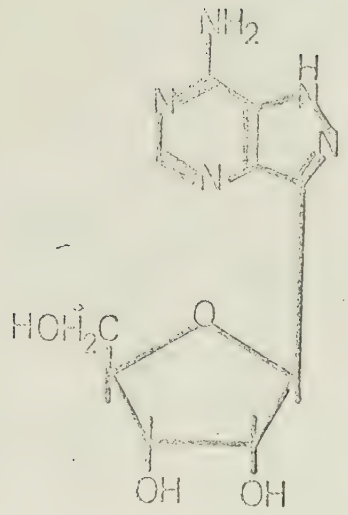
4)- Modification de la partie purique



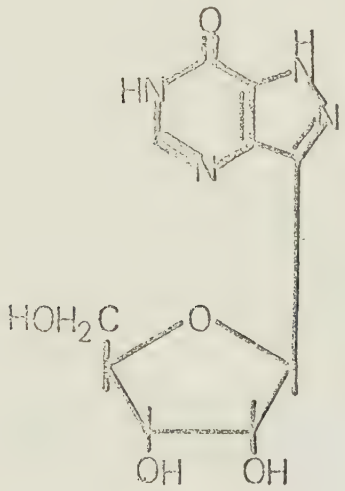
15 R : CN Toyocamycine (S.toyocaensis, S. fungicidus, S. Vendargensis, S.rimosus, etc.) [72-86]

16 : H Tubercidine (S.tubercidicus ; S. sparsogenes, S. cuspidosporus) [87-89]

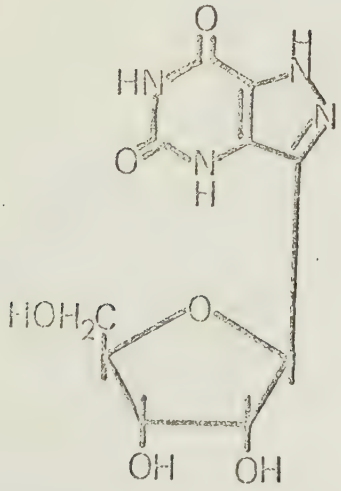
17 : $CONH_2$ Sangivamycine (S.rimosus) [90]



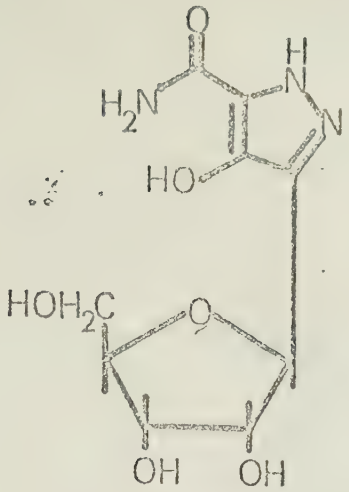
18 Formycine
(N.interforma ; S.lavendulae ; S. gunmaensis) [91-93]



19 Formycine B (N.interforma ; S.lavendulae) [92,94]



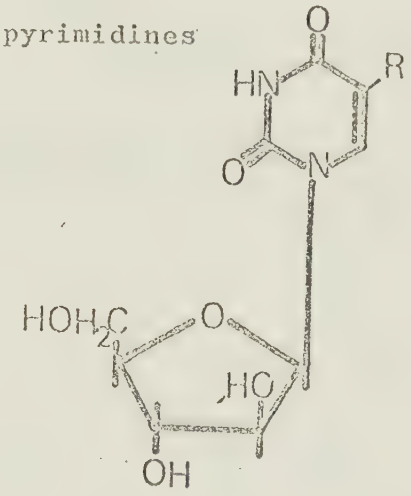
20 Oxoformycine B $^{++}$ (N. interforma) [95-98]



21 Pyrazomycine (S.candidus) [99]

II - Nucléosides pyrimidiques et dérivés

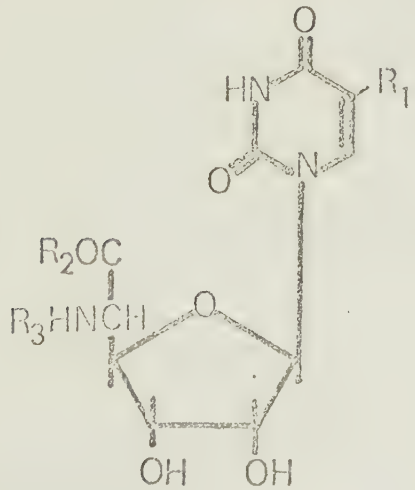
1) - Arabinofuranosylpyrimidines



22 R : CH_3 Spongothymidine (Cry. crypta) [48]

23 : H Spongouridine$^+$ (Cry. crypta) [100, 101]

2) - Modification de la partie glucidique

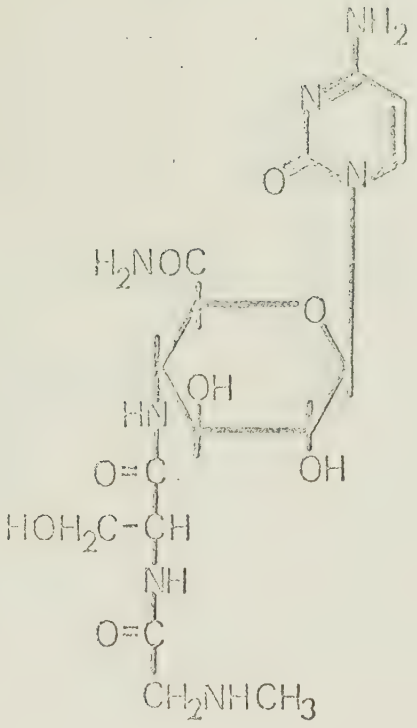


24 Polyoxines A - L (S. cacaoi) [102]

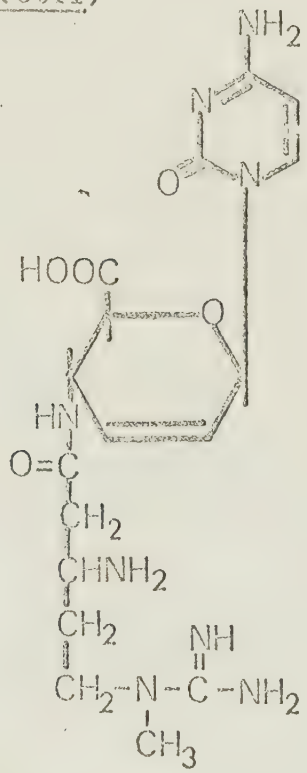
R_1 : $-CH_2OH$, $-COOH$, $-CH_3$, $-H$

R_2 : 3-éthylidène-L-azétidine-2 acide carboxylique ou -OH

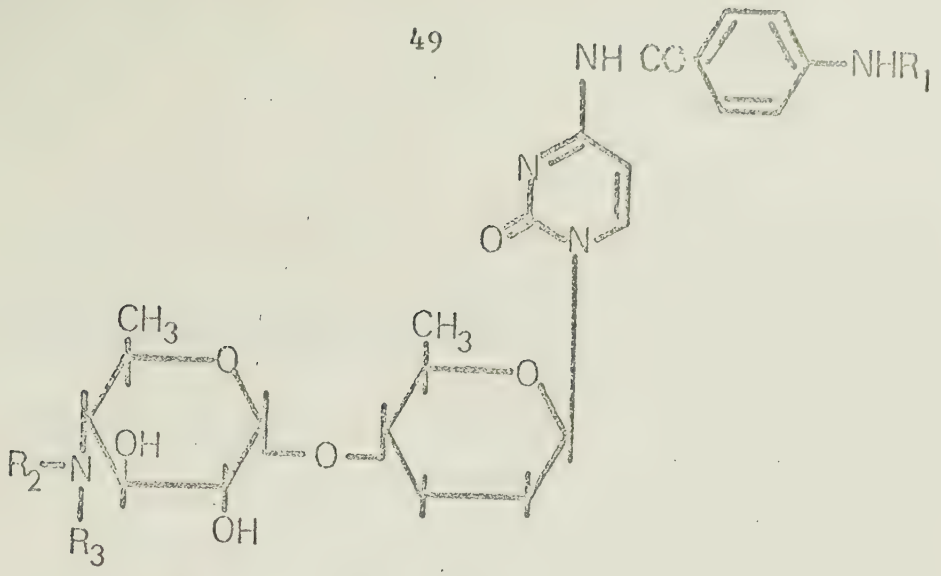
R_3 : 5-O-carbamoyl-2-amino-2-désoxy (ou 3-désoxy) acide



25 Gougérotine (*S.gougerotii*)[103]



26 Blasticidine S (*S.griseochromogenes* ; *S.morookaensis*)[104,105]

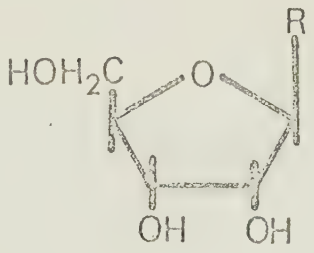


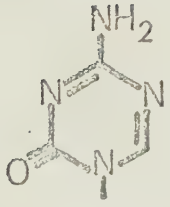
27 R_1 : $CO\overset{CH_3}{\underset{NH_2}{C}}CH_2OH$ R_2 : CH_3 R_3 : CH_3 Amicétine (S.fasciculatis ; S.plicatus) 106-111

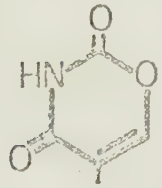
28 : " : H : CH_3 Bamicétine (S. plicatus)[111]

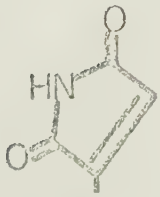
29 : H : CH_3 : CH_3 Plicacétine (S. plicatus)[111,112]

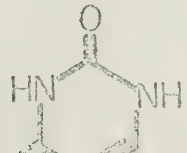
3) - Modification de la partie pyrimidique



R =  5-Azacytidine (S. ladakanus)[113]

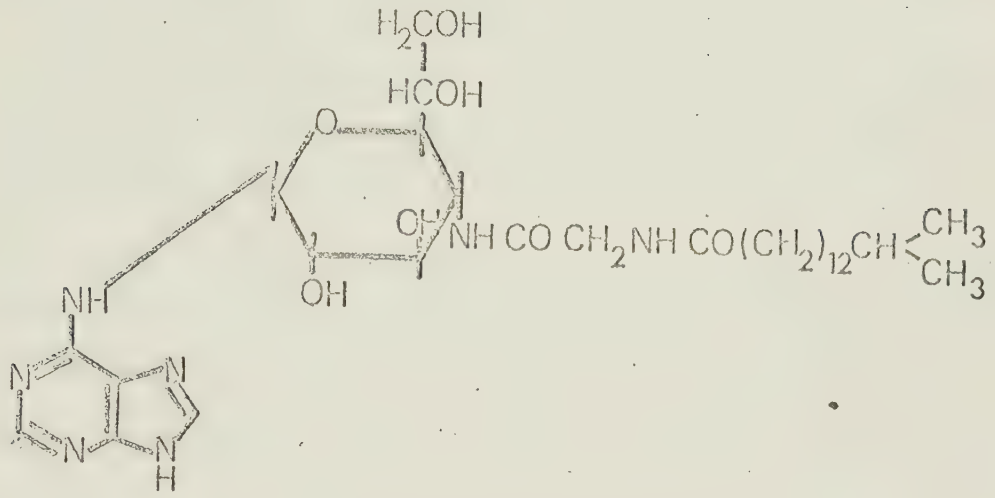
R =  Oxazinomycine (S. tanesashinensis)[114]

R =  Showdomycine (S. showdoensis)[115]

R =  Pseudouridine++ (S. ladakanus)[116,117]

III - Analogues des nucléosides

Dérivé purique



34 Septacidine (S.fimbriatus)[118]

En plus de ces 34 substances, l'amicétine A et C(S. vinaceus-drappus)[119] et la coformycine (N. interforma, S. kaniharaensis)[120-122] ont été trouvées dans la nature mais leurs structures ne sont pas encore élucidées.

L'arabinofuranosylcytosine[123] a été synthétisée mais n'a pas été trouvée dans la nature.

La structure de l'hikizimycine montre une ressemblance avec celles des nucléosides antibiotiques suivants : l'amicétine, la bamicétine, la plicacétine, la gougérotine et la blasticidine S.

Les caractéristiques structurales et les propriétés biochimiques de ces cinq antibiotiques peuvent se résumer ainsi :

(1) - ils contiennent un noyau cytosine dont la position N 1 est glycosidiquement substituée par un glucide; leurs liaisons nucléosidiques sont β.

(2) - ils contiennent un 4-amino-4-désoxy-hexose dont la configuration peut être considérée comme un analogue structural du D-gluco-pyranose dont le groupement amine est substitué.

(3) - les groupements en position C-6 des glucides sont modifiés.

(4) - ils contiennent au moins un acide aminé.

Bien que le mécanisme de la biosynthèse des nucléosides puriques et pyrimidiques soit bien établi, il n'existe que peu de travaux concernant la biosynthèse des nucléosides antibiotiques.

Cependant, nous possédons quelques informations sur la blasticidine-S. Seto et ses collaborateurs[124-126] ont effectué des recherches sur la biosynthèse de la blasticidine-S. Ils ont démontré que le noyau cytosine de cet antibiotique provient bien de la cytosine, la partie glucide du D-glucose, l'acide blastidique de la L-arginine et le groupement N-méthyle de l'acide blastidique de la méthionine. Le mécanisme de formation du β-acide aminé à partir de l'α-arginine n'est pas encore élucidé.

Le mode d'action de ces antibiotiques a été mis en évidence par comparaison avec la puromycine, à cause de leurs ressemblances structurales. Ces antibiotiques bloquent la synthèse protéique en jouant un rôle inhibiteur dans l'élongation de la chaîne peptidique.[127]

La ressemblance structurale de l'hikizimycine avec ces cinq nucléosides semble indiquer des similitudes dans leurs mécanismes d'action. Mais il faut, en même temps, noter des différences entre l'hikizimycine et ces nucléosides. Elles sont les suivantes :

(1) - l'absence d'acide aminé

(2) - le fait que le groupement amine du 4-amino-4-désoxy-pyranose n'est pas substitué

(3) - la présence du deuxième glucide aminé, 3-amino-3-désoxy-D-glucopyranose

Il serait donc intéressant de faire des études comparatives entre le mécanisme d'action de l'hikizimycine et ceux des cinq analogues.

Il serait aussi intéressant d'obtenir des dérivés de l'hikizimycine pour effectuer des tests antibiotiques.

PARTIE EXPERIMENTALE

METHODES GENERALES

Toutes les évaporations ont été faites sous vide, au-dessous de 45º et toutes les réactions, sous agitation magnétique.

Analyse quantitative

Les "bioassays" sur microorganismes, effectués selon la méthode du disque en papier[128], nous ont permis d'établir un étalonnage et, ainsi, de mesurer quantitativement l'hikizimycine.
Nous avons utilisé l'hikizimycine recristallisée comme témoin et Pseudomonas fluorescens comme microorganisme.

Chromatographie sur gel de silice

Les chromatoplaques de Kieselgel F_{254} (Merck) ont été utilisées pour la chromatographie analytique sur couche mince; la chromatographie préparative a été effectuée, en général, sur colonne de SilicAR (100-200 mesh Mallinckrodt). Les solvants utilisés sont les suivants :

a) - benzène-méthanol = 55-45
b) - " " = 100-30
c) - benzène-acétone = 55-45
d) - " " = 60-40
e) - benzène-acétate d'éthyle = 50-50
f) - " " " = 20-80
g) - " " " = 80-20

Chromatographie sur papier

Nous avons utilisé la méthode descendante, sur papier Whatman Nº1 pour la chromatographie analytique et Nº3 pour la chromatographie préparative.

L'appellation "chromatographie simplifiée sur papier" signifie une chromatographie effectuée dans une cuve en verre (hauteur : 20 cm) selon la méthode ascendante.

Solvants utilisés :

A) - n-butanol-acide acétique-eau = 4-1-2,5
B) - " " " = 4-1-2
C) - " " " = 5-1-4
D) - " " " = 4-1-5
E) - " " " = 2-2-1
F) - n-butanol-éthanol-eau = 5-1-4
G) - n-butanol-pyridine-eau = 6-4-3

H) - phénol-eau ammoniacale (1%) = 4-1

I) - acétate d'éthyle-pyridine-eau = 2-1-2

J) - acétone-eau = 95-5

K) - n-propanol-alcool benzylique-eau-acide formique(85%)=50-72-20-20

Préparation des résines

Toutes les résines ont été traitées, avant l'emploi, d'abord par la soude (2 M), ensuite par l'acide chlorhydrique (2 M) pour les résines acides et dans l'ordre inverse pour les résines basiques; enfin elles ont été lavées, sur la colonne, avec de l'eau.
Le Dowex 1 (CO_3^{--}) a été préparé, après ces différents traitements, par agitation avec le carbonate de sodium et lavage à l'eau.
L'Amberlite (NH_4^+) a été préparée en agitant la résine acide dans l'ammoniaque puis en la lavant à l'eau.
Les Dowex utilisés sont : Dowex 50Wx8 (100-200 mesh) et Dowex 1x2 (100-200 mesh).
Les volumes des résines ont été mesurés dans l'eau.

Préparation du charbon

Le charbon a été traité de la même façon que les résines acides. Le volume a été mesuré dans l'eau.

Chromatographie sur Sephadex

Le Sephadex G-10 a été utilisé dans l'eau pour les produits solubles dans l'eau et le Sephadex LH-20 dans l'acétate d'éthyle pour les produits solubles dans les solvants organiques.

Révélateurs

1) lumière U.V.
2) acide sulfurique : la solution d'acide sulfurique (10%, v/v) dans l'eau) a été pulvérisée sur la plaque et celle-ci a été chauffée à 150º.
3) acide périodique-benzidine : la solution d'acide périodique (2% dans l'eau) a été diluée 10 fois dans l'acétone. Le papier a été trempé un moment dans cette solution et laissé à l'air pendant 5 minutes. Le papier a ensuite été trempé dans la solution de benzidine (benzidine 900 mg, acétone 475 ml, eau 22 ml, acide acétique 3 ml) et laissé à l'air.

4) nitrate d'argent : la solution de nitrate d'argent (10% dans l'eau) a été diluée 10 fois dans l'acétone. Le papier a été trempé un moment dans cette solution et laissé à l'air pendant 5 mites. Ensuite le papier a été trempé dans la solution de soude (NaOH 10 g, eau 50 ml, éthanol 200 ml), lavé avec de l'eau et laissé à l'air.

5) phtalate acide d'aniline : la solution de phtalate acide d'aniline (0,2% dans le n-butanol saturé avec de l'eau) a été pulvérisée sur le papier et celui-ci a été chauffé à 60º.

6) ninhydrine : la solution de ninhydrine (0,2% dans n-butanol saturé avec de l'eau) a été pulvérisée, puis la feuille de papier a été chauffée à 100º.

Analyses physiques

Les points de fusion ont été déterminés sur l'appareil de Ernst Leitz.

Les analyses ont été faites par le service de Microanalyses du C.N.R.S.. à Gif-sur-Yvette.

Les spectres de masse ont été exécutés sur spectrographe AEI MS 9. Les spectres de RMN ont été réalisés sur le spectromètre A 60A avec le tétraméthylsilane comme indicateur interne (δ =0). Les singulet, doublet, triplet, quadruplet et multiplet sont respectivement désignés par les lettres s, d, t, q et m.

Les spectres I.R. (nujol, sauf indication particulière) sont enregistrés sur un appareil Perkin-Elmer modèle 257.

Les pouvoir rotatoires ont été mesurés sur le Quick polarimètre Jouan-Roussel.

ISOLEMENT ET PURIFICATION DE L'HIKIZIMYCINE

Nous avons trouvé l'hikizimycine dans le milieu de culture à la fin de la fermentation. L'antibiotique a été isolé par passage sur résines échangeuses d'ions ou sur charbon activé. Les essais d'extraction par des solvants organiques comme le n-butanol, l'acétate d'éthyle, l'éther ou le benzène ayant donné des résultats négatifs, nous avons utilisé plusieurs sortes de résines pour le test d'adsorption; celles convenant le mieux pour la purification de l'antibiotique sont les résines d'acidité faible (par exemple : l'Amberlite IRC-50) sous la forme NH_4^+, qui adsorbent l'antibiotique sélectivement. Au contraire, les résines d'acidité faible sous la forme de H^+ adsorbent peu l'antibiotique et les résultats d'acidité forte (Amberlite IR-120, Amberlite XE-100) sous la forme H^+ ou NH_4^+ adsorbent aussi bien les impuretés que l'antibiotique (Tableau VII)

Le mycelium et le milieu ont été séparés par centrifugation et le surnageant a été déposé sur la colonne d'Amberlite IRC-50 sous la forme NH_4^+. L'antibiotique a été élué par l'ammoniaque et l'éluat a été chromatographié sur la colonne de charbon activé avec l'acide faible. Les fractions qui présentaient une activité antibiotique ont été réunies puis, après neutralisation avec Amberlite IR-45 sous la forme OH^-, ont été amenées a pH 3,5 avec trois acides minéraux différents (les acides chlorhydrique, bromhydrique et sulfurique). Nous avons ainsi obtenu trois sels qui cristallisent dans le méthanol ou le mélange : éthanol-eau et qui nous ont donné un solide microcristallin. Le sel de l'acide bromhydrique fut plus facile a cristalliser que les deux autres.

Test d'adsorption

Après centrifugation de la culture, le surnageant (3mg/ml), pH 8,0) a été déposé sur les différentes colonnes de résines (50 ml) (voir ci-dessous), à la vitesse de 50 ml/h.

(1) IRC-50 (H^+)
(2) IRC-50 (NH_4^+)
(3) IR-120 (H^+)
(4) IR-120 (NH_4^+)
(5) XE-100 (H^+)

Après avoir déposé le surnageant (500 ml) sur chaque colonne, nous avons lavé celle-ci avec de l'eau (100 ml) et à l'ammoniaque (0,5 M).

Les effluents et les éluats ont été recueillis par fraction de 50 ml et soumis au test d'antibiose après neutralisation.

Dans le tableau VII sont consignés les résultats concernant ce test d'adsorption.

T A B L E A U VII

Test d'adsorption de l'hikizimycine sur les colonnes de résines échangeuses d'ions

Résines	1.	2.	3.	4.	5.
N° des premières fractions présentant une activité antibiotique	1	6	8	8	10
Couleur des effluents	+++	+++	+	++	+
N° des fractions des éluats présentant une activité antibiotique	néant	1-3	2-4	2-4	2-5
Couleur de ces éluats	±	+	+++	+++	+++

Couleur claire = + ++

Couleur foncée = +++ (similaire à la couleur du bouillon).

Purification de l'Hikizimycine

Lorsque la culture dans le fermenteur est terminée, le bouillon (12 litres) est centrifugé pendant 15 minutes à la vitesse de 3000 t/m. Le surnageant (10 litres) qui, d'après le test d'antibiose, contient l'antibiotique (34 g) est passé sur la colonne d'Amberlite IRC-50 sous la forme NH_4^+) (1,5 l), à la vitesse de 1 l/heure. Après lavage de la colonne avec de l'eau (2l), l'antibiotique est élué par l'ammoniaque (0,5 M).

Les résultats de cette chromatographie sont donnés dans le tableau V III.

T A B L E A U VIII

Elution de l'hikizimycine de la colonne d'Amberlite IRC-50 (NH_4^+)

N° des fractions	volume (l)	pH	quantité d'antibiotique (g)
1	1,5	7,0	0,00
2	0,7	7,0	0,42
3	1,0	8,5	24,00
4	0,5	10,0	5,50
5	0,5	10,0	0,00

Les fractions 2, 3 et 4 ont été réunies, neutralisées par l'acide chlorhydrique et concentrées jusqu'à 50 ml environ.

Cette solution a été versée sur la colonne (diamètre 8 cm) de charbon activé (Wako Activated Charcoal for Chromatography, 11). Les sels minéraux ont été éliminés par élution avec de l'eau (2 l) et l'antibiotique a été obtenu par élution avec l'acide chlorhydrique (0,1 M ; 5 l). Chaque fraction a été controlée par absorption U.V.

L'éluat a été passé sur colonne d'Amberlite IR-45 sous la forme OH^- (0,5 l) pour éliminer l'acide chlorhydrique et la colonne a été lavée avec de l'eau jusqu'à ce que les effluents deviennent neutres. Les effluents réunis ont été ajustés à pH 4 avec l'acide bromhydrique et amenés à sec. La poudre jaune obtenue a été dissoute dans le méthanol à 60° ; la solution méthalonique a été concentrée de moitié et laissée dans un réfrigérateur pendant 3 jours. Les cristaux (11 g) ont été recristallisés (3,5 g) dans le méthanol.

L'électrophorèse sur papier à bas voltage montre que l'antibiotique migre vers la cathode dans le tampon à pH : 5,7 et 9. Par exemple, l'antibiotique migre de 4,1 cm vers la cathode sous les conditions suivantes : 300 V/35 cm, de 2 à 2,5 mA/5 cm, 1,5 heure, 15°, tampon de Sörensen (M/30, pH 5), papier filtre de Toyo N° 51.

Les cristaux de bromhydrate d'hikizimycine sont blancs. Chauffés, ils deviennent bruns entre 214° et 215°, puis noirs aux environs de 230°, sans toutefois fondre avant 300°.

L'hikizimycine est optiquement active : $[\alpha]_D^{23°5} = -40°6$ (c 1, H_2O).

Le bromhydrate de cet antibiotique se dissout très facilement dans l'eau, légèrement dans le méthanol et pratiquement pas dans les autres solvants tels que l'acide acétique, la pyridine, l'éthanol, l'acétate d'éthyle et le chloroforme. L'antibiotique base se dissout aussi facilement dans l'eau mais ne se dissout pas dans les solvants organiques.

L'antibiotique donne des réactions positives avec le nitrate de cérium et l'acide periodique, légèrement positives avec la ninhydrine. Mais, les tests du biuret, de Molisch, de Fehling, d'Ehrlich et du chlorure de fer sont négatifs.

Peracétylhikizimycine 2

Le bromhydrate d'hikizimycine (350 mg), mis en suspension dans le mélange anhydride acétique (15 ml) - pyridine (10 ml) est agité pendant deux jours à température ambiante. Le mélange réactionnel est versé dans de l'eau glacée, puis extrait cinq fois au chloroforme. L'extrait chloroformique est lavé successivement avec une solution saturée de sulfate acide de potassium, puis une solution saturée de bicarbonate de sodium et enfin avec de l'eau jusqu'à neutralité. Après sèchage et évaporation, le produit brut obtenu (374 mg) est chromatographié sur une colonne de 70 g de silice Davison (100-200 mesh); élué par le benzène (60 ml) on obtient de la peracétylhikizimycine (326 mg) qui a été purifiée par cristallisation dans le mélange $CHCl_3$-éther (77 mg); Rf sur C.M. 0,90 (solvant a) et Rf 0,07 (solvant c) (révélateurs 1 et 2) ; F. : 167-172° : $[\alpha]_D^{25}$ + 31,8° (C 0,5, $CHCl_3$) ; I.R. ($CHCl_3$) : cm^{-1} 1748 (fort, OAc), 1675 (NHCO) ; R.M.N. ($CDCl_3$) : δ 7,48 et 7,96, d($J_{5,6}$ 7,8 Hz, 2 H éthyléniques de la cytosine), 6,05 et 6,38, d (2 H anomériques ; J 9 Hz), 1,80 - 2,40 (39 H ; 13-$COCH_3$) ; masse : m/e 1129 (M^+, $C_{47}H_{63}N_5O_{27}$), 977 (M^+-B), 330 (ion a), 154 (B+2H).

N,N'-Diacétylhikizimycine 3

A une suspension de peracétylhikizimycine (4,10 g) dans le méthanol anhydre (40 ml), on ajoute une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol (0,20 M, 15 ml). Après agitation pendant 20 minutes à la température ambiante, la solution est neutralisée par l'Amberlite IRC-50 (H^+) puis passée sur une colonne de la même résine. La solution réactionnelle ainsi que les eaux de lavage sont réunies et évaporées. On obtient un résidu blanc (2,10). L'essai de cristallisation dans le méthanol a fourni un précipité de N,N'-diacétylhikizimycine 3 (173 mg).

La chromatographie sur papier du produit 3 ci-dessus a été effectuée dans le solvant A, en présence de bromhydrate d'hikizimycine comme témoin. Les taches ont donné les Rf suivants : témoin : 0,05 (révélateurs : 1, 3 et 6); produit testé : 0,12 (révélateurs : 1 et 3 ; faiblement positif à 6). F. : 244-253° ; $[\alpha]_D^{25°}$ - 10,0° (C 0,7; H_2O) ; I.R. : 3 000 - 3 500 cm^{-1} (large, OH), 1655 (-CONH-) ; R.M.N. (D_2O) : δ 6,17 et 7,82, d ($J_{5',6'}$ 7,8 Hz, 2 H éthyléniques de la cytosine), 4,70 et 5,65, d (2 H anomériques), 2,13 et 2,12 s (2 NAc) ; microanalyse : calculée pour $C_{25}H_{41}N_5O_{16}$, 2 H_2O ; C 42,67, H 6,40, N 9,95. Trouvé : C 42,41, H 6,95, N 9,58.

N,N'-Diacétyl-N,O-perméthylhikizimycine 4

Le produit 3 (1 mg) est traité par l'hydrure de sodium (dispersion 50 % dans l'huile, Fluka, 10 mg, lavé trois fois à l'éther) dans le dimethylformamide (0,5 ml) ; on additionne de l'iodure de méthyle (0,3 ml) et le mélange est agité pendant 45 minutes; de l'eau est ajoutée et le mélange extrait avec du clhoroforme. L'extrait chloroformique a été lavé avec de l'eau, séché sur sulfate de sodium et amené à sec. La N,N'-diacétyl-N,O-perméthylhikizimycine 4 brute a été soumise à l'analyse par spectrométrie de masse . Un dérivé perdeutériométhylé a été préparé par la même méthode avec l'iodure de méthyle trideutérié.

Masse :

- le dérivé perméthylé : m/e 863 (M^+, $C_{39}H_{69}N_5O_{16}$), m/e 725 (M^+ - B), m/e 260 (ion c) ;
- le dérivé perdeutériométhylé : m/e 905 (M^+), m/e 761 (M^+ - B), m/e 272 (ion c)

Acétylation et désacétylation de la cytidine

La cytidine (50 mg) est acétylée dans le mélange pyridine (2 ml)-anhydride acétique (2 ml). Le lendemain, la solution est concentrée et l'anhydride acétique restant est éliminé par évaporations successives de benzène.

Masse :

- m/e 411 (M^+ $C_{17}H_{21}N_3O_9$ pour la peracétylcytidine).
- R.M.N. ($CDCl_3$): δ 2,07, 2,10, 2,14 s, (3OAc) ; 2,30, s,(NAc).

La désacétylation, faite dans les mêmes conditions pour le composé 2, a donné un produit (=cytidine) dont le spectre R.M.N. montre l'absence de groupement acétylé.

Méthanolyse de la N,N'-diacétylhikizimycine 3

Le produit 3 (2,47 g) est dissous dans le méthanol anhydre (300 ml) préalablement saturé d'acide chlorhydrique gazeux. La réaction est accomplie à température ambiante. La solution méthanolique est abandonnée 9 heures à reflux. Elle est ensuite concentrée et l'acide chlorhydrique restant a été éliminé par évaporation répétée de méthanol anhydre.

Par chromatographie sur papier du résidu (solvant B), on met trois taches en évidence : une tache ninhydrine-positive (Rf0,20), une tache faiblement ninhydrine-positive (Rf 0,25) et une tache acide periodique-benzidine-positive (Rf 0,06) qui montre une absorption dans l'U.V..?

Ce mélange (2,48 g) est dissous dans un volume minimum d'eau et déposé sur la colonne de Dowex 50 W (H^+) (50 ml). La colonne est éluée à l'eau (100 ml) et avec des solutions aqueuses d'acide chlorhydique en concentration croissante. Chaque fraction (50 ml) neutralisée par l'Amberlite IR-45 (OH^-) est évaporée à sec.

Les résidus provenant de l'élution à l'eau fournissent un résidu hygroscopique (373 mg). Celui-ci, chromatographié sur papier (solvant B) donne parmi des taches nitrate d'argent-positives, une tache principale (+) (Rf 0,25, révélateurs ; 4 (faible) et 6 (faible).

(+) Ce produit (145 mg) après chromatographie préparative sur papier, dans le solvant B, est chromatographiquement identique au méthyl-3-acétamido-3-désoxy-α-D-glucopyranoside.
Chromatographie sur papier (solvant B), Rf : 0,25, révélateur 4.
Chromatographie sur couche mince (solvant b), Rf:0,17, révélateur 2.
Son dérivé peracétylé est aussi identique au dérivé peracétylé du méthyl-3-acétamido-3-désoxy-α-D-glucopyranoside (échantillon authentique);
Chromatographie sur couche mince (solvant d), Rf:0,41, révélateur 2.
Nous avons donc conclu que ce produit est le fragment glucide aminé dont le groupement N-acétyle est conservé pendant la méthanolyse.

Les résidus provenant de l'élution à l'acide chlorhydrique (0,25) ont donné, pour les fractions 4 à 10, un résidu hygroscopique (420 mg). La chromatographie sur papier de ce produit (solvant B) montre une tache (Rf 0,20 ; révélateurs ; 3 (faible), 4 et 6) (fragment I).

Les résidus provant de l'élution à l'acide chlorhydrique (1 M) ont donné, pour les fraction 7 à 14, un résidu cristallin (1,58 g) dont la chromatographie sur papier (solvant B) révèle une tache (Rf 0,06 ; révélateurs ; 1, 3, 4 et 6 (faible) (fragment II).

Quant aux résidus provenant de l'élution par l'acide chlorhydrique (2M), ils ont donné, pour les fractions 2 à 7, l'hikizimycine (105 mg), caractérisée par son spectre de R.M.N.

Méthyl-3-amino-3-désoxy-D-glucopyranoside 5 (α-anomère) et 5' (β-anomère)

Le fragment I (420 mg) a été purifié par chromatographie préparative sur papier (solvant B, révélateur des références ; 6).

L'évaporation de l'éluat aqueux fournit un mélange des chlorhydrates des produits 5 et 5' (300 mg) sous la forme d'une poudre blanche hygroscopique.

R.M.N. (CD_3OD) : 4,78, d ($J_{1,2}$ 3, 5 Hz, H-1 eq.), 4,31, d ($J_{1,2}$ 7 Hz, H-1 ax.), 3,58, s (OMe, eq.), 3,48, s (OMe, ax.).

Microanalyse : calculé pour $C_7H_{15}NO_5$.HCl ; C 36,60, H 6,97 ; Cl 15,40. trouvé : C 36,20 ; H 7,35 ; Cl 15,96.

Méthyl-3-acétamido-2,4,6-tri-O-acétyl-3-désoxy-α-D-glucopyranoside 6

Le mélange des produits 5 et 5' (260 mg) est dissous à 0° dans un mélange d'anhydride acétique (5ml) et de pyridine (5 ml) et agité à température ambiante pendant 20 heures. Le processus usuel après acétylation (décrit pour le produit 1) a donné un produit brut (280mg) qui, après décoloration par le charbon (Norite) dans le méthanol, est cristallisé dans le benzène (160 mg). La recristallisation dans le benzène donne un produit analytique 6 (109 mg). Rendement : 22 %.

F. : 171-175°. $[\alpha]_D^{20}$ + 102,7° (c0,5, $CHCl_3$).
I.R. : cm-1 1740 (OAc), 1650 (NHCO).
R.M.N. (C_6D_6), δ 4,79 d, ($J_{1,2}$ 2,0 Hz, H-1 eq.), 3,04, s. 3H(OMe,ax.), 1,63, 1,67, 1,74 et 1,78 s. (4Ac).
Masse : m/e 361 (M^+), 330 (M^+-OMe), 301 (M^+- AcOH).
Microanalyse : calculé pour $C_{15}H_{23}NO_9$: C 49,86 ; H 6,42 ; N 3,88
Trouvé : C 49,88 ; H 6,20 ; N 3,99.

Méthyl-3-acétamido-3-désoxy-α-D-glucopyranoside 7

Le produit 6 (500 mg) est O-désacétylé comme décrit précédemment pour la préparation du produit 3. Le processus usuel fournit une poudre hygroscopique (310 mg) par évaporation du solvant. Cette poudre a été soumise à la chromatographie préparative sur papier (solvant A, révélateur 4, Rf 0,58). L'extrait aqueux, après évaporation est dissous dans l'éthanol et les impuretés insolubles sont éliminées. L'évaporation de ce solvant a livré la poudre hygroscopique du produit 7 (210 mg).

$[\alpha]_D^{20}$ + 136,6 ° (c0, 5 H_2O).
R.M.N. (D_2O) : δ 4,72 d, ($J_{1,2}$ 3,5 Hz, H-1eq.), 3,45 s,3H (OMe,ax.), 2,00 s, (NAc).
Masse : m/e 204 (M^+- OMe, $C_9H_{17}NO_6$).
La microanalyse n'a pas donné de résultats valables à cause de la nature hygroscopique du produit.

Oxydation periodique [26] du méthyl-3-acétamido-3-désoxy-α-D-glucopyranoside 7

Le produit 7 (4,70 mg), dissous dans le métaperiodate de sodium (0,02 M, 5 ml), est laissé à l'obscurité, à température ambiante pendant 24 heures. La solution saturée de bicarbonate de sodium (20 ml), puis l'iodure de potassium (à20 %, 4 ml) sont ajoutés et le mélange laissé à l'obscurité pendant 15 minutes. Le titrage avec l'arsénite de sodium (0,005 M) montre qu'il n'y a pas de consommation de periodate alors que le méthyl-α-D-glucopyranoside, utilisé comme témoin, consomme 2,1 moles de periodate en trois heures.

Fragment II 8

La cristallisation du fragment II (1,58 g) dans l'eau-éthanol donne le produit pur 8 (1,22 g), F. 181-185° ; $[\alpha]_D^{20°}$ - 4,8° (C0,5 H_2O).

Microanalyse : calculé pour $C_{15}H_{26}N_4O_{10}$-2HCl C 36,36 ; H 5,66 ; N 11,31 ; O 32,32 ; Cl 14,34.
Trouvé C 35,97 ; H 5,90 ; N 11,04 ; O 35,94 ; Cl 10,95.
I.R. : cm^{-1} 3.000-3.500 (large,OH). R.M.N. (D_2O) : δ 6,27 et 7,92, d ($J_{5,6}$ 7,8 Hz, 2 H éthylénique de la cytosine), 5,77, d ($J_{1,2}$ 8,7 Hz, H anomérique).

Dérivé peracétylé 9 du fragment II

Le produit 8 (200 mg) est acétylé comme décrit pour l'hikizimycine. Le produit brut (383 mg) est cristallisé dans le benzène (208 mg), puis recristallisé dans l'acétate d'éthyle-benzène (183 mg).
F. 156-159° ; $[\alpha]_D^{20°}$ + 46,2 (C 0,7 ; $CHCl_3$).
Microanalyse : calculé pour $C_{35}H_{46}N_4O_{20}$ C 49,88 ; H 5,46 ; N 6,65 ; O 38,00 .
Trouvé C 49,30 ; H 5,33 ; N 6,48.
I.R. : cm^{-1} 1750 et 1220 (OAc), 1670 et 1550 (NHCO), R.M.N. ($CDCl_3$) : δ 2,19 et 2,25, s (2 NAc), 1,90-2,05, (24 H ; 8 OAc), Masse : m/e 842 (M^+, $C_{35}H_{46}N_4O_{20}$), 782 (M^+ - AcOH), 690 (M^+ - B), 154 (B + 2).

Dérivé N-acétylé 10 du fragment II

Le produit 9 (250 mg) est traité par le méthanolate de sodium comme décrit pour le produit 3.
La cristallisation dans l'eau-éthanol fournit le produit 10 (96 mg).
F. : 195-199° ; $[\alpha]_D^{20°}$ + 1,8 (C 0,5 ; H_2O).
I.R. (KBr) : cm^{-1} 3.000-3.500 (large, OH), 1650 et 1540 (NHCO),
R.M.N. (D_2O) : δ 5,69, d ($J_{1,2}$ 8,5 Hz, H anomérique), 2,12, s (NAc).

Dérivé N-acétylé N,O permethylé 11 du fragment II

Le produit 10 (~ 1 mg) est méthylé comme décrit pour le produit 4.
Masse : m/e 618 (M^+ ; $C_{28}H_{50}N_4O_{11}$), 480 (M^+-B).

Tetrahydropyrimidin-2-one 12

Le fragment II (500 mg), obtenu lors de la méthanolyse de la N,N'-diacétylhikizimycine 3, est dissous dans l'eau (20 ml) et ajouté au catalyseur en suspension (50 mg oxyde de platine dans 10 ml d'eau), préalablement saturé d'hydrogène. Le produit consomme 2,8 moles d'hydrogène en 24 heures dans les conditions suivantes : agitation vigoureuse en atmosphère d'hydrogène, à températures et à pression ambiantes. Le spectre R.M.N. du produit après hydrogènation montre la disparition des signaux des protons éthyléniques. Le produit obtenu, sans purification préalable, est dissous dans l'acide chlorhydrique (1,5 M, 15 ml) et la solution laissée 1 h 30 à reflux. La solution est neutralisée par l'Amberlite IR-45 (OH^-) et filtrée ; la résine est ensuite lavée. Le filtrat et les eaux de lavage réunis sont concentrés. La chromatographie sur papier (solvant B) de cette solution met en évidence un glucide aminé que nous appellerons hikosamine, de Rf 0,12 (révélateurs 3,4,5,6) et un autre produit, de Rf 0,43 ; révélateurs : 1 (faible), 4 (noir faible). Le mélange est déposé sur une colonne de Dowex 50 W (H^+) (50 ml) et successivement élué par des solutions aqueuses d'acide chlorhydrique 0,1 M, 0,25 M et 1 M. Les éluats de 50 ml sont recueillis.

L'hikosamine (338 mg) a été éluée à l'acide chlorhydrique 0,1 M et la partie aglycone (62 mg) à l'acide chlorhydrique 1 M. La chromatographie préparative sur papier (solvant B, révélateur des produits de référence : 4) de ce dernier produit livre un solide amorphe (50 mg) qui est identifié comme étant le tétrahydropyrimidin-2-one.
L'échantillon authentique (65 mg) est préparé à partir de la cytosine (150 mg) par la même méthode, décrite ci-dessus.
Chromatographie sur papier : solvant B, Rf 0,43 révélateur 4.
R.M.N. : δ 3,42, t, (4H ; $J_{4,5} = J_{6,5}$ 6 Hz), 1,96, quint., (2H ; $J_{5,4} = J_{5,6}$ 6 Hz).
Masse : m/e 100 (M^+ $C_4H_8N_2O$).

Picrate de tétrahydropyrimidin-2-one

Le produit 12 (50 mg) est dissous dans le volume minimum d'eau et ajouté à une solution à 2 % (10 ml) d'acide picrique, faite à partir d'un

mélange de méthanol et d'eau 1 : 1. Des cristaux jaunes apparaissent immédiatement. La recristallisation dans l'eau donne le picrate de tétrahydropyrimidin-2-one (37 mg).
F. : 190-191° ; pas d'abaissement du point de fusion du mélange.
Microanalyse : calculé pour $C_{10}H_{11}N_5O_8$, C 36,48 ; H 3,37 ; N 21,27.
Trouvé : C 36,22 ; H 3,43 ; N 21,38

Méthylhikosaminide 14 (α-anomère) et 14' (β-anomère)

Le dérivé hydrogéné (2,03 g) du fragment II 8 est agité à 0° dans le mélange : eau (50 ml), méthanol (5ml), Dowex 1x2 (CO_3^{--}) (60 ml) et anhydride acétique (2,5 ml). Au bout d'une heure et demie, ce mélange est filtré et la résine bien lavée. Le filtrat et les eaux de lavage sont passés sur colonne d'Amberlite IR-120 (H^+), chauffés à reflux et amenés à sec.

Le dérivé N-acétylé obtenu (1,84g) a été sèché sur anhydride phosphorique sous vide pendant la nuit. Ce produit est dissous dans le méthanol (100 ml) contenant de l'acide chlorhydrique (9 % poids/vol.) et la solution est laissée à reflux. Au bout de 8 heures, la solution est concentrée jusqu'à la consistance d'un sirop, puis neutralisée par l'Amberlite IR-45 (OH^-). Les résines sont éliminées de la solution et bien lavées avec de l'eau. Le filtrat et les eaux de lavage réunis sont concentrés à 3 ml et déposés sur colonne de Dowex 50 W (H^+) (50 ml), puis la colonne est lavée à l'eau (100 ml). Les éluats (acide chlorhydrique 0,1 N) sont de 50 ml ; chaque fraction est immédiatement neutralisée par l'Amberlite IR-45 (OH^-) et évaporée à sec. Les fractions 2 à 9 donnent un mélange des produits 14 et 14' (1,12 g).

Méthyl-peracétyl-hikosaminide 15 (α-anomère) et 15' (β-anomère)

Le mélange des produits 14 et 14' (1,10 g) est dissous dans l'anhydride acétique (25 ml) et la pyridine (25 ml), puis agité a température ambiante.

Les acétates des deux anomères obtenus (2,12 g) sont dissous dans une petite quantité de solvant e et chromatographiés sur colonne de gel de silice (120 g), préalablement saturée par le même solvant. L'éluat est collecté par fractions de 20 ml. Le produit 15 (468 mg) est récupéré dans les fractions 17 à 21, un mélange des produits 15 et 15' (209 mg) dans les fractions 22 et 23, le produit 15' (401 mg) dans les fractions 24 à 27 et le produit non identifié (451 mg) dans les fractions 28 à 34.

Chaque anomère est cristallisé dans l'éthanol (rendement : produit 15 368 mg, produit 15' 369 mg).

15 - chromatographie sur couche mince (solvant e) Rf 0,28 ;
F. 180,5-181,5° ; $[\alpha]_D^{20°}$ + 85,0° (C 1,0 $CHCl_3$)
microanalyse : calculé pour $C_{30}H_{43}NO_{19}$; C 49,93; H 5,96; N 1,94 ; O 42,16 ; trouvé : C 49,27 ; H 5,88 ; N 2,28 ; O 41,09.
masse : m/e 721 (M^+ ; $C_{30}H_{43}NO_{19}$).

15'- chromatographie sur couche mince (solvant e) Rf : 0,19 ;
F. 169-170° ; $[\alpha]_D^{20°}$ + 15,6° (C 1,0 $CHCl_3$)
microanalyse : trouvé : C 49,22 ; H 5,84 ; N 2,41 ; O 41,20 ;
masse : m/e 721 (M^+, $C_{30}H_{43}NO_{19}$).

Méthyl-N-acétyl-hikosaminide 16 (α-anomère) et 16' (β-anomère).

Les produits 16 (170 mg) et 16' (165 mg) sont préparés à partir des produits 15 et 15' (300 mg) par O-désacétylation comme décrit pour le produit 3.

Bien que les produits n'aient pu être cristallisés, ils sont homogènes en chromatographie sur papier.

Chromatographie sur papier : Rf : 16 0,20 ; 16' 0,21 (solvants F, révélateurs 3 et 4).

Méthyl-N-acétyl-N,O-perméthyl-α-hikosaminide . 17

Le produit 16 (∼1 mg) est une suspension d'hydrure de sodium (10 mg, hydrure de sodium dispersé dans l'huile à 50 %, lavé trois fois à l'éther avant emploi) dans du diméthylformamide (0,1 ml) à température ambiante. Au bout de dix minutes, de l'iodure de méthyle est ajouté (0,01 ml) et la solution agitée. Trente minutes après, le mélange est extrait par le chloroforme et la solution chloroformique lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec. Le produit 17 obtenu est soumis à l'analyse par spectrométrie de masse.

Méthyl-4-acétamido-4-désoxy-α-D-glucopyranoside 18

Le produit 16 (216 mg ; 0,561mmole) dissous dans l'eau (10 ml) ; une solution aqueuse d'acide periodique (HIO_4, $2H_2O$: 767 mg : 3,336 mmole dans 5 ml d'eau) est additionnée goutte à goutte pendant 15 minutes. Le mélange est ensuite laissé à température ambiante pendant 15 minutes, puis, rendu légèrement alcalin par addition d'une solution saturée d'hydroxyde de baryum, neutralisé par la carboglace et filtré. Du borohydrure de sodium (150 mg) est ajouté au filtrat (20 ml) et la solution abandonnée à température ambiante. Après une nuit, la solution est passée sur colonne d'Amberlite IR-120 (H^+, 5 ml) et la colonne est lavée avec de l'eau. Les éluats sont réunis et évaporés. Le résidu est dissous dans du méthanol (30 ml) et cette solution est évaporée. Ce processus est répété à trois reprises. Le résidu (127 mg) est chromatographié sur colonne de Sephadex G-10 (100 g) et des élutions de 10 ml sont recueillies. L'évaporation du solvant des fractions 13 et 14 donne le produit 18 (79 mg, rendement : 60 %).

Les essais de cristallisation du produit n'ont pas réussi.

Chromatographie sur papier (solvant F : Rf 0,41 : $[\alpha]_D^{20°}$ + 139,1° (C 0,3, H_2O).

R.M.N. (D_2O) : δ 4,90, d ($J_{1,2}$ 2,5 Hz, H-1eq.), 3,46, s (OMe ax.), 2,07, s (NAc),

Masse : m/e 204 (M^+ -OMe).

N-Carbobenzyloxy-hikosamine 20

Le fragment II (250 mg) a été hydrogéné comme décrit pour le produit 14 et le produit obtenu a été hydrolysé pendant une heure et demie à 100° par l'acide chlorhydrique (1,5M, 15 ml). L'hydrolysat a été neutralisé et chromatogtaphié comme pour le produit 14. L'éluat (acide chlorhydrique 0,1 M) est neutralisé par l'Amberlite IR-45 (OH^-), la solution et filtrée et la résine lavée. L'évaporation du filtrat et des eaux de lavage réunis donne un résidu amorphe 13 (165 mg). Ce résidu est dissous dans l'eau (2 ml) et le chlorure de carbobenzyloxy (0,4 ml) ajouté goute à goute à cette solution, celle-ci étant maintenue alcaline par addition de bicarbonate de sodium. Le mélange est abandonné à température ambiante pendant une nuit. La solution est éxtraite trois fois à l'éther et la phase aqueuse neutralisée par l'Amberlite IRC-50 (H^+) et amené à sec. La chromatographie simplifiée sur papier (solvent E) donne une tache majeure de Rf 0,55 (N-carbobenzyloxy-hikosamine 20)

(révélateurs : 1,3,4 et 5) et une tache faible de Rf 0,17 (hikosamine) (révélateurs : 3,4,5 et 6). Une partie ($\sim$ 30 mg) de ce mélange est soumis à la chromatographie préparative sur papier (solvant E). Le produit 20 (Rf 0,55) a été récupéré. I.R. : cm^{-1} 1690et 1540 (NHCO); 770, 750, 730et 695 (phenyl).

N-Carbobenzoxy-per-O-acétylhikosamine 21

Le reste du mélange (la carbobenzoxy-hikosamine 20 et l'hikosamine) est séché en présence d'anhydride phosphorique pendant une nuit et réduit en poudre. La poudre est mise en suspension dans le mélange anhydride acétique (3 ml) - pyridine (3 ml) à 0° et lorsque la majeure partie du produit est dissoute; la solution est laissée à température ambiante pendant une nuit.
La solution est traitée comme décrit pour le produit 2, et fournit un résidu (245 mg). A cette étape, la chromatographie sur couche mince (solvant e) donne une tache de Rf 0,30 (révélateurs 1 et 2; produit 21) et une faible tache de Rf 0,03 (révélateur 2; peracetylhikosamine). Ces deux produits ont été séparés sur colonne de gel de silice (30 g) dans le même

solvant. Des éluats de 10 ml sont recuillis. Le produit 21 (185 mg) est récupéré dans les fractions 7 à 11 et la peracétylhikosamine (35 mg) dans les fractions 13 et 15. Les essais de cristallisation du produit 21 n'ont pas réussi.
R.M.N.(C_6D_6) : δ 1,50 - 2,10, 9 OAc (27 H).
Masse : m/e 782 (M^+-OAc), 781 (M^+-AcOH).

N-Carbobenzyloxy-2,3,6,7,8,9,10,11-octa-O-acétylhikosamine 22

Le produit 21 (180 mg) est dissous dans du tétrahydrofurane (0,7 ml) et la pipéridine (0,18 ml) a été ajoutée goute à goute à cette solution à 22°. La réaction a été suivie par chromatographie sur couche mince. Au bout de ½ heure plus de la moitié du produit de départ avait disparu; une heure après, il ne restait que des traces du produit de départ et au bout d'une heure et demie le produit de départ n'était plus détectable. Du chloroforme est ajouté à la solution, puis le mélange est lavé avec une solution saturée et froide de sulfate acide de potassium et ensuite avec du l'eau. La solution chloroformique est séchée sur sulfate de sodium et amenée à sec; nous avons ainsi obtenu le produit 22 (175 mg). Chromatographie sur couche mince : solvant e Rf 0,18; solvant f Rf 0,59(révélateurs : 1, 2 et 5).
R.M.N. (C_6D_6) : δ 1,50 - 2,10, 8 OAc (24 H) .

Mélange des 4-N-acétyl-2,3,7,8,9,10,11-hepta-O-acétylhikosamine 23, 2,3,6,7,8,9,10,11-octa-O-acétylhikosamine 28 et 4-N-acétyl-2,6,7,8,9,10,11-hepta-O-acétylhikosamine 33

Le produit 22 (170 mg) est dissous dans de l'éthanol absolu (20 ml) et agité vigoureusement avec du palladium sur charbon (150 mg) en atmosphère d'hydrogène. Deux heures après, la solution est filtrée, et évaporée. On obtient le mélange des produits 23, 28 et 33 (150 mg). Chromatographie sur couche mince (solvant e) : tache majeure Rf 0,01(révélateurs : positifs 2,5 et 6; négatif 1); tache faible Rf 0,06 (révélateurs : positifs 2 et 5; faible positif 6; négatif 1); (solvant f) : tache majeure Rf 0,08 (révélateurs : positifs 2,5 et 6);tache faible Rf 0,13 (révélateurs : positifs 2 et 5).
Contrôle produit de départ 22 (solvant f) : Rf 0,59.

D-Mannose 26, D-glycéro-D-galactoheptose 31 et N-acétylhikosamine 34

Le mélange des produits 23, 28 et 33 (145 mg) est dissous dans du méthanol (3 ml); une solution aqueuse de métapériodate de sodium (440 mg dans 4 ml d'eau) est ajoutée goutte à goutte, à température ambiante; et la solution totale est abandonnée une nuit à l'obscurité. La suspension obtenue est extraite trois fois par le chloroforme et la solution chloroformique lavée avec de l'eau et séchée sur sulfate de sodium. L'évaporation du solvant fournit un solide (80 mg). Ce solide est dissous dans du méthanol (1 ml); du méthanolate de sodium en solution dans le méthanol anhydre (0,22 M); 0,3 ml) est ajouté et le mélange est laissé à température ambiante. Au bout de vingt minutes; la solution est neutralisée par l'Amberlite IR-120 (H^+) et filtrée. L'évaporation du filtrat donne un solide (36 mg). La chromatographie simplifiée sur papier (solvants F et G) montre trois taches majeures (révélateurs : 3,4 et 5). Les produits 26, 31 et 34 sont séparés par chromatographie préparative sur papier (solvant G) : Rf 26 0,42; 31 0,27; 34 0,16 (révélateur 4). D'autres produits très polaires sous forme de traces ont donné de faibles taches avec le révélateur 5. Les poids des produits 26, 31 et 34 sont respectivement : 4,00 mg, 9,65 mg et 10,80 mg. Les produits 26 et 31 sont chromatographiés une seconde fois sur papier dans le solvant H : Rf 26 0,378; 31 0,230; rendements : 26 4,00 mg; 31 9,50 mg. Une partie de ces produits a servi aux tests chromatographiques sur papier.

$[\alpha]_D^{20°}$: 26 = +10,3° (c 0,4; H_2O); 31 = +44,0° (c 0,95; H_2O).

Isherwood et coll.[35] et Hirst et coll.[36] ont établi la chromatographie sur papier des hexoses en utilisant l'acétate d'éthyle-pyridine-eau : 2-1-2 et le N-butanol-éthanol-eau : 5-1-4 comme solvants. Bien que nous ne possédions que les D-glucose, D-galactose, D-mannose et D-talose comme témoins, plusieurs essais chromatographiques de 26 dans les mêmes solvants nous ont permis de conclure que l'hexose que nous avions obtenu était le D-mannose ou son énantiomorphe, le L-mannose (voir Tableau IX).

TABLEAU IX

Chromatographie sur papier des hexoses

	Rf dans le solvant : acétate de éthyle-pyridine-eau 2:1:2	Rf dans le solvant : n-butanol-éthanol-eau 5:1:4
Galactose	0,175	0,070
Glucose	0,195	0,090
Allose	0,22	-
Gulose	0,23	0,12
Mannose	0,24	0,11
Altrose	0,27	0,17
Talose	0,285	0,19
Iodose	0,31	0,18

Cette conclusion a été ensuite confirmée par les chromatographies avec le D-mannose comme témoin, dans d'autres solvants fréquemment utilisés pour la séparation des glucides. Ce sont : n-butanol-acide-acétique-eau = 4:1:5[37]; phénol-eau(1% d'ammoniaque) = 4:1[37]; n-butanol-pyridine-eau = 6:4:3 [38]; acétate d'éthyle-acide acétique-eau = 3:1:3 [39].

Enfin, le pouvoir rotatoire de cet hexose $[\alpha]_D^{20°}$ + 10°,3 (c 4; H_2O), après les deux chromatographies sur papier, nous a indiqué qu'il est bien le D-mannose.

Les pouvoirs rotatoires de tous les hexose sont consignés sur le Tableau X.

T A B L E A U X

Pouvoirs rotatoires des 16 hexoses

		$[\alpha]_D$				$[\alpha]_D$
Allose	D	+ 0,58	+ 14,41	Mannose	D	+ 14,2
	L	- 1,9			L	-14,0
Altrose	D	+32,6		Gulose	D	+ 61,6
	L	-32,3			L	- 20,4
Glucose	D	+52,5		Idose	D	+ 15,8
	L	-51,4			L	- 17,4
Galactose	D	+80,2		Talose	D	+ 20,6
	L	-74,0			L	- 16,9

D'après ces résultats, dans l'heptose que nous avons obtenu, les carbones 3 à 6 doivent avoir une configuration D-manno : or, cet heptose doit être soit le D-glycéro-D-galacto-heptose, soit son épimère à la position carbone 2, le glycéro-D-talo-heptose.

Davies[40] a établi une méthode systématique pour l'identification de tous les heptoses par chromatographie sur papier. Les solvants qu'il a utilisés sont : n-butanol-pyridine-eau = 6:4:3; phénol-eau eau (1% d'ammoniaque) = 4:1, acétone-eau = 95:5 et n-propanol-alcool benzylique-acide formique(85 %)-eau = 50:72:20:20.

Dans le système de solvants : n-butanol-pyridine-eau = 6:4:3, seul le D-glycéro-D-galacto-heptose et son énantiomorphe migrent entre la D-glucosamine et le maltose; le D-glycéro-D-talo-heptose migre entre la L-arabinose et D-xylose dans le même système de solvants.

Deux essais chromatographiques ont montré que notre heptose est le D-glycéro-Dgalacto-heptose. Les chromatographies dans les trois autres solvants ont confirmé cette conclusion. Il migre moins que le maltose dans le système de solvants : phénol-eau(1% d'ammoniaque)

il migre entre la D-glucosamine et le D-galactose dans le système : acétone-eau et entre le maltose et la D-glucosamine dans le système n-propanol-alcool benzylique-acide formique (85 %)-eau = 50:72:20:20.

Nous avons donc conclu que l'heptose 31 est le D-glycéro-D-galacto-heptose.

Peracétyl-β-D-mannose 27

Le produit 26 (4 mg) est dissous dans le mélange anhydride acétique (0,5 ml) et pyridine (0,5 ml) à 0° et la solution laissée pendant une nuit à température ambiante. Après évaporation et séchage le résidu est soumis à la chromatographie sur couche mince et montre une tache majeure à Rf 0,23(solvant g). Ce produit (8,5 mg) est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (8g; solvant g : fractions de 5 ml).

Chaque fraction est testée par le révélateur 2. Le produit 27 est récupéré entre les fractions 16 et 19 et l'évaporation du solvant livre un solide (4,4 mg).

Masse : m/e 331 (M^+-OAc).

Peracétylhikosamine 35

Le produit 34 est traité comme décrit pour le produit 27. Le produit brut 35 (23,0 mg) obtenu est soumis à l'analyse par spectrométrie de masse sans purification préalable.

Masse : m/e 690 (M^+-OAc).

Peracétyl-D-glycéro-β-D-galactoheptose 32

Le produit 31 (9,5 mg) est acétylé et traité comme décrit pour le produit 27. La chromatographie sur couche mince (solvant g) révèle une tache majeure de Rf 0,27 et une tache faible de Rf 0,34. Le solide obtenu est purifié dans les mêmes conditions que le produit 27; le produit principal est récupéré dans les fractions 17 à 24 et rechromatographié sur colonne de Séphadex LH-20 (75 g, $\sim$ 150 ml). Les éluats sont recueillis par fractions de 5 ml. Le produit 32 (12 mg) est récupéré dans les fractions 14 à 16. Les essais de cristallisation ont été infructueux.

$\alpha_D^{20°}$ + 50,7° (c 1,2; $CHCl_3$).

Chromatographie sur couche mince (solvant g) ; Rf = 0,27.

Masse : m/e 403 (M^+ - OAc).

BIBLIOGRAPHIE

1 - S. Takeuchi, K. Hilayama, K. Ueda, H. Sakai et H. Yonehala,
J. Antibiotics (Tokyo), 11A, 1, 1958.

2 - H. Umezawa, Y. Okami, T. Hashimoto, Y. Suhala, M. Hamada et
T. Takeuchi,
ibid., 18A, 101, 1965.

3 - T.G. Pridham et D. Gottlieb,
J. Bact., 56, 107, 1948.

4 - S.A. Waksman,
The Actinomycetes, 2, William & Wilkins Co, 1961.

5 - T.V. Parke et W.W. Davis,
Anal. Chem., 26, 642, 1954.

6 - N. Ōtake, S. Takeuchi, T. Endō et H. Yonehala,
Tetrahedron Letters, 1411, 1965.

7 - Y. Suhala, K. Maeda, H. Umezawa et Ōno,
10th Symposium on the Chemistry of Natural Products (Tokyo),
78, 1966.

8 - F.A. Hochstein et K. Murai,
J. Amer. Chem. Soc., 76, 5080, 1954.

9 - E.H. Flynn, M.V. Sigal Jr, P.F. Wiley et K. Gerzon,
ibid., 76, 3121, 1954.

10 - C.L. Stevens, P. Blumbergs et F.A. Daniher,
ibid., 85, 1552, 1963.

11 - H. Ogawa, T. Itō, S. Inoue, et S. Kondō,
J. Antibiotics, 11A, 70, 1958.

12 - S. Hanessian,
Methods of Biochemical analysis, 19, 105, Interscience.

13 - J.S. Brimacombe, B.D. Jones, M. Stacey et J.J. Willard,
Carbohyd. Res., 2, 167, 1966.

14 - A. Adam, J. F. Petit, J. Wietzerbin-Falszpan, P. Sinay,
D.W. Thomas et E. Lederer,
FEBS Letters, 4, 87, 1969.

15 - R.U. Lemieux, R.K. Kullnig, H.J. Bernstein et W.G. Schneider,
J. Amer. Chem. Soc., 79, 1005, 1957 ; 80, 6098, 1958 ;
82, 6427, 1960.

16 - R.U. Lemieux, R.K. Kullnig et R.Y. Moir,
ibid., 80, 2237, 1958.

17 - S. Brownstein,
ibid., 81, 1606, 1959.

18 - S. Brownstein et R. Miller,
J. Org. chem., 24, 1886, 1959.

19 - M. Karplus,
J. Chem. Phys., 30, 11, 1959.

20 - J.I. Musher,
ibid., 34, 594, 1961.

21 - J.I. Musher,
J. Amer. Chem. Soc., 83, 1146, 1961.

22 - R.W. Lenz et J.P. Heeschen,
J. Polymer Sci., 51, 247, 1961.

23 - J.M. van der Veen,
J. Org. Chem., 28, 564, 1963.

24 - S. Peat et L.F. Wiggins,
J. Chem. Soc., 1810, 1938.

25 - M.J. Cron, D.L. Evans, F.M. Palermiti, D.F. Whitehead, I.R. Hooper, P. Chu et R.U. Lemieux,
J. Amer. Chem. Soc., 80, 4741, 1958.

26 - E. Müller et O. Friedberger,
Ber., 35, 2652, 1902.

27 - H. Iwasaki,
Yakugaku-Zasshi, 82, 1368, 1962.

28 - J.J. Fox, Y. Kuwada, K.A. Watanabe, T. Ueda et E.B. Whipple,
Antimicrobial Agents Chemotherapy, 518, 1964.

29 - E.J. Reist, R.R. Spencer, D.F. Calkins, B.R. Baker et L. Goodman,
J. Org. Chem., 30, 2312, 1965.

30 - J.D. Dutcher, D.R. Walters et O. Wintersteiner,
J. Org. Chem., 28, 995, 1963.

31 - R.M. Rowell et M.S. Feather,
Carbohydrate Res., 4, 486, 1967.

32 - D.R. Whitaker, M.E. Tate et C.T. Bishop,
Can. J. Chem., 40, 1885, 1962.

33 - F. Micheel et W. Lengsfeld,
Ber., 89, 1246, 1956.

34 - A.B. Foster et M. Stacey,
Advances Carbohy. Chem., 7, 247, 1952.

35 - F.A. Isherwood et M.A. Jermyn,
Biochem. J., 48, 515, 1951.

36 - E.L. Hirst et J.K.N. Jones,
Discuss. Faraday Soc., 7, 268, 1949.

37 - S.M. Partridge,
Biochem. J., 42, 238, 1948.

38 - A. Jeanes, C.S. Wise et R.J. Dimeer,
Anal. Chem., 23, 415, 1951.

39 - M.A. Jermyn et F.A. Isherwood,
Biochem. J., 44, 402, 1949.

40 - D.A.L. Davies,
Biochem. J., 67, 253, 1957.

41 - W. Klyne,
Biochem. J., 47, XLI, 1950.

42 - J. Staněk,
Nature, 179, 98, 1957.

43 - A.K. Ganguly, O.Z. Sarre et J. Morton,
Chem. Comm., 1488, 1969.

44 - K.G. Cunningham, S.A. Hutchinson, W. Manson et F.S. Spring,
J. Chem. Soc., 2299, 1951.

45 - W.W. Lee, A. Benitez, L. Goodman et B.R. Baker,
J. Amer. Chem. Soc., 82, 2648, 1960.

46 - E.J. Reist, A. Benitez, L. Goodman, B.R. Baker et W.W. Lee,
J. Org. Chem., 27, 3274, 1962.

47 - Parke, Davis et Co.,
Pat. Bergique N° 671.557, 1967.

48 - W. Bergmann et R.J. Feeney,
J. Amer. Chem. Soc., 72, 2809, 1950.

49 - W. Bergmann et R.J. Feeney,
J. Org. Chem., 16, 981, 1951.

50 - L. Ehrenberg, H. Hedström, N. Löfgren et B. Takman,
Svensk Kem. Tidsskr., 58, 269, 1946.

51 - K. Isono et S. Suzuki,
J. Antibiotics (Tokyo), 13A, 270, 1960.

52 - E. Cherbuliez et K. Bernhard,
Helv. Chim. Acta, 15, 464, 1932.

53 - E.A. Kaczka, E.L. Dulaney, C.O. Gitterman, H.B. Woodruff et K. Folkers,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 14, 452, 1964.

54 - S. Frederiksen, H. Malling et H. Klenow,
Biochim. Biophys. Acta, 95, 189, 1965.

55 - C.A. Ammann et R.S. Safferman,
Antibiot. Chemotherapy, 8, 1, 1958.

56 - A.J. Guarino et N.M. Kredich,
Biochim. Biophys. Acta, 68, 317, 1963.

57 - N.N. Gerber et H.A. Lechevalier,
J. Org. Chem., 27, 1731, 1962.

58 - R.J. Suhadolnik, B.M. Chassy et G.R. Waller,
Biochim. Biophys. Acta, 179, 258, 1969.

59 - J.N. Porter, R.I. Hewitt, C.W. Hesseltine, G. Krupka, J.A. Lowery, W.S. Wallace, N. Bohonos et J.H. Williams,
Antibiot. Chemotherapy, 2, 409, 1952.

60 - N.M. Kredich et A.J. Guarino,
J. Biol. Chem., 236, 3300, 1961.

61 - A.J. Guarino et N.M. Kredich,
Federation Proc., 23, 371, 1964.

62 - E.J. Backus, H.D. Tresner et T.H. Campbell,
Antibiot. Chemotherapy, 7, 532, 1957.

63 - S.O. Thomas, V.L. Singleton, J.A. Lowery, R.W. Sharpe, L.M. Pruess, J.N. Porter, J.H. Mowat et N. Bohonos,
Antibiot. Ann., 716, 1956 - 1957.

64 - R.I. Hewitt, A.R. Gumble, L.H. Taylor et W.S. Wallace,
Antibiot. Ann., 722, 1956 - 1957.

65 - H. Yüntsen, H. Yonehala et H. Ui,
J. Antibiotics (Tokyo), 7A, 113, 1954.

66 - W. Schroeder et H. Hoeksema,
J. Amer. Chem. Soc., 81, 1767, 1959.

67 - H. Yüntsen, K. Ōkuma, Y. Ishii et H. Yonehala,
J. Antibiotics (Tokyo), 9A, 195, 1956.

68 - H. Hoeksama, G. Slomp et E.E. van Tamelen,
Tetrahedron Letters, 1787, 1964.

69 - Y. F. Shealy et J. D. Clayton,
J. Amer. Chem. Soc., 88, 3885, 1966.

70 - Y.F. Shealy et J.D. Clayton,
J. Amer. Chem. Soc., 91, 3075, 1969.

71 - T. Kusaka, H. Yamamoto, M. Shibata, M. Muloï, T. Kishi et K. Mizuno,
J. Antibiotics (Tokyo), 21A, 255, 1968.

72 - H. Nishimula, K. Katagili, K. Satō, M. Mayama et N. Shimaoka,
J. Antibiotics (Tokyo), 9A, 60, 1956.

73 - K. Ōkuma,
J. Antibiotics (Tokyo), 13A, 361, 1960.

74 - K. Ōkuma,
J. Antibiotics (Tokyo), 14A, 343, 1961.

63 - S.O. Thomas, V.L. Singleton, J.A. Lowery, R.W. Sharpe, L.M. Pruess, J.N. Porter, J.H. Mowat et N. Bohonos,
Antibiot. Ann., 716, 1956 - 1957.

64 - R.I. Hewitt, A.R. Gumble, L.H. Taylor et W.S. Wallace,
Antibiot. Ann., 722, 1956 - 1957.

65 - H. Yüntsen, H. Yonehala et H. Ui,
J. Antibiotics (Tokyo), 7A, 113, 1954.

66 - W. Schroeder et H. Hoeksema,
J. Amer. Chem. Soc., 81, 1767, 1959.

67 - H. Yüntsen, K. Ōkuma, Y. Ishii et H. Yonehala,
J. Antibiotics (Tokyo), 9A, 195, 1956.

68 - H. Hoeksama, G. Slomp et E.E. van Tamelen,
Tetrahedron Letters, 1787, 1964.

69 - Y. F. Shealy et J. D. Clayton,
J. Amer. Chem. Soc., 88, 3885, 1966.

70 - Y.F. Shealy et J.D. Clayton,
J. Amer. Chem. Soc., 91, 3075, 1969.

71 - T. Kusaka, H. Yamamoto, M. Shibata, M. Muloï, T. Kishi et K. Mizuno,
J. Antibiotics (Tokyo), 21A, 255, 1968.

72 - H. Nishimula, K. Katagili, K. Satō, M. Mayama et N. Shimaoka,
J. Antibiotics (Tokyo), 9A, 60, 1956.

73 - K. Ōkuma,
J. Antibiotics (Tokyo), 13A, 361, 1960.

74 - K. Ōkuma,
J. Antibiotics (Tokyo), 14A, 343, 1961.

75 - H. Yamamoto, S. Fujii, K. Nakazawa, A. Miyake, H. Hitomi et M. Imanishi,
Takeda Kenkyusho Nempo, 16, 26, 1957.

76 - A. Aszalos, P. Lemansky, R. Robison, S. Davis et Berk,
J. Antibiotics (Tokyo), 19A, 285, 1966.

77 - K. Kikuchi
J. Antibiotics (Tokyo) 8A, 145, 1955.

78 - K. Katagili, K. Sato et S. Nishiyama,
Shionogi Kenkyusho Nempo, 7, 715, 1957.

79 - M. Matsuoka et H. Umezawa,
J. Antibiotics (Tokyo), 13A, 114, 1960.

80 - M. Matsuoka,
J. Antibiotics (Tokyo), 13A, 121, 1960.

81 - A.A. Stheeman et A.P. Struyk,
Pat. Suisse N° 331.988, 1953.

82 - A.P. Struyk et A.A. Stheeman,
Pat. Britannique N° 764.198, 1956.

83 - A.P. Struyk et A.A. Stheeman,
Pat. Hollandaise N° 109.006, 1964.

84 - K.V. Rao et D.W. Renn,
Antimicrobial Agents Chemotherapy, 77, 1963.

85 - K.V. Rao, W.S. Marsh et D.W. Renn,
Pat. Amer. N° 3.116.222, 1963.

86 - F. Arcamone, G. Cassinelli, G. D'Amico et P. Orezzi,
Experientia, 24, 441, 1968.

87 - K. Anzai et S. Malumo,
J. Antibiotics (Tokyo), 10A, 20, 1957.

88 - W.J. Wechter et A.R. Hanze,
Pat. Amer. N° 3.336.289, 1967.

89 - E. Higashide, T. Hasegawa, M. Shibata, K. Mizuno et H. Akaïke,
Takeda Kenkyusho Nempo, 25, 1, 1966.

90 - K.V. Rao et D.W. Renn,
Antimicrobial Agents Chemotherapy, 77, 1963.

91 - M. Holi, E. Itō, T. Takida, G. Koyama, T. Takeuchi et H. Umezawa,
J. Antibiotics (Tokyo), 17A, 96, 1964.

92 - S. Aïzawa, T. Hidaka, N. Ōtake, H. Yonehala, K. Isono, N. Igalashi et S. Suzuki,
Agr. Biol. Chem. (Tokyo), 29, 375, 1965.

93 - Nippon Kayaku Co Ltd, Pat. Jap., N° 10.928, 1967.

94 - G. Koyama et H. Umezawa,
J. Antibiotics (Tokyo), 18A, 175, 1965.

95 - M. Ishizuka, T. Sawa, G. Koyama, T. Takeuchi et H. Umezawa,
J. Antibiotics (Tokyo), 21A, 1, 1968.

96 - M. Ishizuka, T. Sawa, S. Holi, H. Takayama, T. Takeuchi et H. Umezawa,
J. Antibiotics (Tokyo), 21A, 5, 1968.

97 - M.R. Sheen, B.K. Kim, H. Martin et R.E. Parks Jr.,
Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 9, 63, 1968.

98 - M.R. Sheen, H.F. Martin et R.E. Parks Jr.,
Mol. Pharmacol., 6, 99, 1970.

99 - R.H. Williams, K. Gerzon, M. Hoehn et D.C. Delong,
158th National Meeting, Amer. Chem. Soc., New-York,
Abstr., Micr. 38, 1969.

100 - D.C. Burke,
J. Org. Chem., 20, 643, 1955.

101 - W. Bergmann et D.C. Burke,
J. Org. Chem., 20, 1501, 1955.

102 - K. Isono, J. Nagatsu, Y. Kawashima et S. Suzuki,
Agr. Biol. Chem., 29, 848, 1965.

103 - T. Kanzaki, E. Higashide, H. Yamamoto, M. Shibata, K. Nakazawa,
H. Iwasaki, T. Takewaka et A. Miyake,
J. Antibiotics (Tokyo), 15A, 93, 1962.

104 - S. Takeuchi, K. Hilayama, K. Ueda, H. Sakai et H. Yonehala,
J. Antibiotics (Tokyo), 11A, 1, 1958.

105 - T. Tsuluoka et T. Niida,
Meiji Seika Kenkyu Nempo, 23, 1963.

106 - C. De Boer, E.L. Caron et J.W. Hinman,
J. Amer. Chem. Soc., 75, 499, 1953.

107 - J.W. Hinman, E.L. Caron et C. De Boer,
J. Amer. Chem. Soc., 75, 5864, 1953.

108 - M.H. Mc Cormick et M.M. Hoehn,
Antibiot. Chemotherapy, 3, 718, 1953.

109 - K. Tatsuoka, K. Nakazawa, M. Inoue et S. Fujii,
Yakugaku-Zasshi, 75, 1206, 1955.

110 - Y. Hinuma, M. Kuloya, T. Yajima, K. Ishihala, S. Hamada,
K. Watanabe, K. Kikuchi,
J. Antibiotics (Tokyo), 8A, 148, 1955.

111 - T.H. Haskell, A. Ryder, R.P. Frohardt, S.A. Fusari,
Z.L. Jakubowski et Q.R. Bartz,
J. Amer. Chem. Soc., 80, 743, 1958.

112 - P. Sensi, A.M. Greco, G.G. Gallo et G. Rolland,
Antibiot. Chemotherapy, 7, 645, 1957.

113 - M.E. Bergy et R.R. Herr,
Antimicrobial Agents Chemotherapy, 625, 1966.

114 - Haneishi, T. Okazaki , T. Hata, C. Tamula, M. Nomula, A. Naïto, I. Seki et M. Alaï,
J. Antibiotics, 24, 797, 1971.

115 - H. Nishimula, M. Mayama, Y. Komatsu, H. Katō, N. Shimaoka et Y. Tanaka,
J. Antibiotics (Tokyo), 17A, 148, 1964.

116 - W.E. Cohn,
Biochim. Biophys. Acta, 32, 569, 1959.

117 - R.J. Suhadolnik,
Nucleoside Antibiotics, Wiley-Interscience, 273, 1970.

118 - J.D. Dutcher, M.H. von Saltza et F.E. Pansy,
Antimicrobial Agents Chemotherapy, 83, 1963.

119 - C. De Boer et J.W. Hinman,
Pat. Amer. N° 2.909.463, 2.909.464, 1959.

120 - T. Niida, T. Niwa, T. Tsuluoka, N. Ezaki, T. Shōmula et H. Umezawa,
153rd Scientific Meeting of Japan Antibiotics Research Association, Jan., 1967.

121 - T. Sawa, Y. Fukagawa, I. Homma, T. Takeuchi et H. Umezawa,
J. Antibiotics (Tokyo), 20A, 227, 1967.

122 - T. Tsuluoka, N. Ezaki, S. Amano, C. Uchida et T. Niida,
Meiji Seika Kenkyu Nempo, 9, 17, 1967.

123 - E.R. Walwick, W.K. Roberts et C.A. Dekker,
Proc. Chem. Soc., 84, 1959.

124 - H. Seto, I. Yamaguchi, N. Ōtake et H. Yonehala,
Tetrahedron Letters, 3793, 1966.

125 - H. Seto, I. Yamaguchi, N. Ōtake et H. Yonehala,
Agr. Biol. Chem. (Tokyo), 32, 1292, 1968.

126 - H. Seto, N. Ōtake et H. Yonehala,
Agr. Biol. Chem. (Tokyo), 1299, 1968.

127 - S. Pestka,
Cold Spring Harbor Symposium, 34, 395, 1970.

128 - Zikken Nōgeïkagaku, 1, 291, Asakura-shoten (Tokyo).